

**Aus dem medizinischen Zentrum für operative Medizin
Abteilung für Orthopädie und Rheumatologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg**

**Wachstumsverhalten von humanem, trabekulärem
Knochen unter verschiedenen
Belastungsbedingungen in einem neuartigen
Kultur- und Belastungssystem**

**Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt
von**

**Benjamin Daume
aus
Marburg**

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 11.12.2008
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund
Referent: Priv.-Doz. Dr. U. Boudriot
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. R. Stiletto

**für meine geliebte Frau und beste Freundin Eva-Maria
und meine Familie**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Aufbau von Knochen	3
1.1.1. Einteilung	3
1.1.2. Knochenzellen	4
1.1.2.1. Bone Lining Cells	4
1.1.2.2. Osteoblasten	5
1.1.2.3. Osteozyten	5
1.1.2.4. Osteoklasten	6
1.1.3. Interzellulärsubstanz	6
1.1.3.1. Mineralien	6
1.1.3.2. Organische Verbindungen	6
1.1.4. Der histologische Bau von Knochen	7
1.1.5. Funktioneller Bau von Knochen	8
1.2. Regulation des Knochenwachstums	10
1.2.1. Systemische Regulation des Knochenwachstums	10
1.2.1.1. Calcitriol	10
1.2.1.2. Parathormon	11
1.2.1.3. Calcitonin	11
1.2.2. Lokale Regulation des Knochenwachstums	12
1.2.2.1. Prostaglandine	12
1.2.2.2. Prostaglandin E ₂	13
1.2.2.3. Zytokine	14
1.2.2.4. Interleukin 6 (IL-6)	16
1.2.2.5. Tumornekrosefaktor (TNF- α)	18
1.2.2.6. Osteoprotegerin (OPG)	19
1.3. Knochenumbau	21
2. Material & Methoden	26
2.1. Das ZETOS-System	26
2.1.1. Das Belastungssystem	27
2.1.2. Die Kultur- und Belastungskammer	29
2.1.3. Die Perfusionspumpe	30
2.1.4. Das E-Modul	30

2.1.5. Krafteinwirkung auf den Hüftkopf.....	32
2.2. Das Kulturmedium.....	34
2.3. Präparation der Knochenproben.....	35
2.3.1. Entnahme der Knochenproben.....	35
2.3.2. Vorbereitung der Knochenproben.....	37
2.3.3. Einsatz der Knochenzylinder in die Kultur- und Belastungskammer.....	38
2.3.4. Anschluss der Kultur- und Belastungskammer an den Mediumkreislauf.....	38
2.4. Versuchsdurchführung.....	41
2.4.1. Einteilung der Knochenproben in verschiedene Versuchsgruppen.....	41
2.4.2. Versuchsablauf.....	41
2.4.3. Durchführung der polychromen Sequenzmarkierung.....	42
2.4.3.1. Calcein.....	42
2.4.3.2. Alizarin Complexone.....	43
2.4.4. Probenentnahme zur Mediatorenbestimmung.....	43
2.5. Aufarbeitung der Knochenproben.....	45
2.5.1. Alkoholfixierung.....	45
2.5.2. Dehydrierung und Entfettung.....	45
2.5.3. Kunststoffeinbettung.....	46
2.5.4. Anfertigung der Dünnschnitte.....	47
2.5.5. Entacrylierung.....	49
2.6. Histologie.....	51
2.6.1. Die Mason-Goldner-Färbung.....	51
2.6.1.1. Herstellung der Färbelösung.....	51
2.6.1.2. Färbevorschrift.....	52
2.6.1.3. Eindeckung der Präparate.....	53
2.6.2. Die Fluoreszenz-Färbung.....	53
2.6.2.1. Eindeckung der Präparate.....	53
2.6.3. Histologische Auswertungsverfahren.....	54
2.6.3.1. Auswertung der Mason-Goldner-Färbung.....	54
2.6.3.2. Auswertung der Fluoreszenz-Färbung.....	55
2.7. Statistik.....	57

2.7.1. Auswertung der Daten.....	57
2.7.1.1. Kruskal-Wallis-H-Test.....	57
2.7.1.2. Einfaktorielle ANOVA – Post-Hoc nach Bonferroni.....	57
2.7.1.3. T-Test.....	58
2.7.2. Graphische Darstellung der Ergebnisse.....	58
2.7.2.1. Fehlerbalken.....	58
2.7.2.2. Boxplot.....	58
3. Ergebnisse.....	59
3.1. Versuchsverlauf.....	59
3.1.1. Versuchsdurchführung.....	59
3.1.2. pH-Wert.....	59
3.2. Histologie Mason-Goldner-Färbung.....	60
3.2.1. Statistische Auswertung.....	61
3.2.2. Osteoid im Verhältnis zum Totalvolumen.....	61
3.2.3. Osteoid im Verhältnis zum verkalkten Knochen.....	63
3.2.4. Aktive Knochenoberfläche.....	65
3.3. Histologie Fluoreszenz-Färbung.....	67
3.3.1. Calcein im Verhältnis zum verkalkten Knochen.....	68
3.3.2. Alizarin im Verhältnis zum verkalkten Knochen.....	68
3.3.3. Wachstumsrate – Mineral Apposition Rate.....	69
3.4. Lokale Mediatoren.....	70
3.4.1. Statistische Auswertung.....	70
3.4.2. Prostaglandin E2 (25. Versuchstag).....	71
3.4.3. Prostaglandin E2 (38. Versuchstag).....	72
3.4.4. Interleukin-6 (38. Versuchstag).....	73
3.4.5. Tumornekrosefaktor- α (38. Versuchstag).....	74
3.5. E-Modul.....	76
4. Diskussion.....	78
4.1. Das ZETOS-System.....	78
4.2. Histologie.....	83
4.3. Pg E2, IL-6, TNF- α , Osteoprotegerin.....	86
4.4. Ausblick.....	88
5. Anhang.....	89
5.1. Verbrauchsmaterialien & Apparaturen.....	89

5.2. Abkürzungsverzeichnis.....	91
5.3. Literaturverzeichnis.....	92
5.4. Zusammenfassung.....	108
5.5. Liste der akademischen Lehrer.....	111
5.6. Danksagung.....	112

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Etablierung und Entwicklung eines neuen Kultur- und Belastungssystems für trabekulären Knochen erstellt. Das unter dem Namen ZETOS geführte System ist ein mechanisches Belastungs- und Messsystem, kombiniert mit Kultur- und Belastungskammern für trabekulären Knochen. Das ZETOS-System erlaubt es, vollständige zylinderförmige Knochenproben (0,5 cm hoch und 1 cm Durchmesser) mit einer definierten Kompression, Kraft und Frequenz zu belasten.

Die Größe der Knochenzylinder wurde anhand einer Zellzahl von 2 Millionen Zellen innerhalb der Proben berechnet. Diese Zellzahl wird benötigt, um mit den heute verfügbaren Messverfahren die Ausschüttung lokaler Mediatoren innerhalb des Kulturmediums zu bestimmen. Durch ein geschlossenes Kultursystem können die vom Knochen produzierten Mediatoren aus dem Kulturmedium entnommen und bestimmt werden.

Die Knochenzylinder können mit einer definierten Kraft oder Kompression belastet werden, wobei die jeweils andere Größe die Unbekannte darstellt, welche während der Belastung in Echtzeit gemessen wird.

Es können statische Belastungsmuster bis hin zu verschiedenen periodischen Belastungsmustern erzeugt werden, wobei Kompression und Kraft simultan gemessen werden.

In diesem Versuch wurden humane Knochenproben untersucht, welche über 50 Tage ex vivo kultiviert und belastet wurden.

Ziel war es zum Einen, die Möglichkeiten der Langzeitkultur von humanem Knochen und die Kulturbedingungen in dem neuen System zu erforschen, zum Anderen sollten die durch Belastung induzierten Veränderungen der Knochenproben auf morphologischer Ebene und in Bezug auf den Knochenmetabolismus untersucht werden.

Mechanische Belastung beeinflusst die Regulation der Knochenmasse und die Knochenstruktur.

Bereits 1892 beschrieb der Berliner Chirurg Wolff, dass sich Knochen aufgrund von geänderten Belastungsbedingungen umbaut (143).

Die Effekte von Training und mechanischer Belastung auf das muskulo-skeletale System sind seitdem weitläufig untersucht und gut dokumentiert worden. Jedoch sind

die genauen Vorgänge, durch welche mechanische Belastung auf zellulärer Ebene auf den Knochen wirkt, noch nicht vollständig erforscht und verstanden. Bei der Behandlung und Prävention der Osteoporose wird beispielsweise viel Wert auf körperliches Training gelegt. Auch bei der Bruchheilung und Prothesennachbehandlung werden die Patienten heutzutage früh mobilisiert, da dies den Knochenaufbau fördert. Eine erhöhte mechanische Belastung im physiologischen Bereich verstärkt die Proliferation und die Differenzierung der Osteoblasten (7,58,92). Dies führt zu einer Zunahme der Knochendichte und zu einem verminderten Knochenabbau im Alter (37,74,86,119). Eine hyperphysiologische Belastung von Knochen führt zu dessen Abbau (56). Eine verminderte Belastung von Knochen kann jedoch ebenso zur Degeneration führen. Bei Astronauten wurde nach längerem Aufenthalt in Schwerelosigkeit eine verminderte Knochenneubildung festgestellt (80). Es konnte auch eine Abnahme der zur Knochenneubildung erforderlichen Proteine gemessen werden (15). Bei physikalisch aktiven Menschen kann man dagegen eine erhöhte Knochenmasse messen (24).

Die genauen Kontrollmechanismen und Dosisanforderungen zur Beeinflussung des Knochenmetabolismus, in morphologischer und physiologischer Hinsicht, sind noch nicht bis ins Detail erforscht. Lokale Faktoren, wie z.B. Prostaglandine und Zytokine, welche hierbei eine große Rolle zu spielen scheinen, sind von besonderem Interesse.

1.1 Aufbau von Knochen

Knochen ist neben dem Zahnschmelz das härteste Gewebe des menschlichen Körpers und erfüllt verschiedenste Funktionen, zum Einen ist er Stütz- und Schutzgewebe und maßgeblich an der Formgebung des Körpers beteiligt, zum Anderen dient er durch seine Verbindungen zu Sehnen und Muskeln der Kraft- und Bewegungsübertragung zwischen den verschiedenen Körperteilen.

Knochen ist durch seinen hohen Mineralgehalt in der Matrix der wichtigste Kalzium- und Phosphatspeicher des Körpers. Durch Knochenauf- und abbau kann der Kalziumgehalt des Blutes den Bedürfnissen des Organismus angepasst werden.

1.1.1 Einteilung

Makroskopisch können platte, kurze und lange Knochen unterschieden werden. Platte Knochen bilden z.B. das Schulterblatt, das Brustbein und verschiedene Schädelknochen. Kurze Knochen sind z.B. die Wirbelkörper. Als lange Knochen werden typischerweise die Röhrenknochen bezeichnet, welche in den Extremitäten vorkommen. Die Röhrenknochen bestehen aus einer Diaphyse (Mittelteil, Knochenschaft), den Epiphysen (Endteile der Knochen mit den Gelenkflächen) und den Metaphysen (Wachstumszone zwischen der Diaphyse und den Epiphysen). Die Diaphysen der langen Röhrenknochen enthalten das Knochenmark, welches zum Teil an der Blutzellbildung beteiligt ist. Die Metaphysen beinhalten die Wachstumszonen der Knochen, welche für das Längenwachstum verantwortlich sind. Die Epiphysen sind mit einem Netz aus Knochenbälkchen, der Substantia Spongiosa, ausgefüllt. Diese Knochenbälkchen sind so ausgerichtet, dass sie eine möglichst optimale Stellung in Bezug auf die auf sie wirkenden Kräfte haben.

Die typischerweise auf den Knochen wirkenden Druck- und Scherkräfte werden auf diese Weise bestmöglichst verteilt. Aus dieser Anordnung ergeben sich die sogenannten Trajektorien, die Hauptbelastungslinien der Epiphysen (Abb. 1.2).

Ändert sich nun die Art und Richtung der Kräfte, reagiert der Knochen darauf mit einem Umbau dieses Bälkchennetzwerks, um wieder eine optimale Kräfteverteilung zu erreichen.

1.1.2 Knochenzellen

Knochen besteht ganz allgemein aus verschiedenen Knochenzellen und der Interzellulärsubstanz.

Zu den Knochenzellen zählt man im Einzelnen die Osteozyten, die in den Knochen eingelagert sind. Die Osteoblasten dienen dem Knochenaufbau indem sie die Knochengrundsubstanz auf der Knochenoberfläche synthetisieren. Die Vorläuferzellen, zu denen auch die Bone Lining Cells gerechnet werden, sind ruhend der Knochenoberfläche aufgelagert und können sich durch Aktivierung zu Osteoblasten umwandeln. Die Osteoklasten sind für den Knochenabbau zuständig. Die Vorläuferzellen, Osteoblasten und Osteozyten sind alle mesenchymaler Herkunft und gehen aus lokalen Osteoprogenitorzellen hervor (126-128).

Die Osteoklasten gehen aus der Fusion mononukleärer Vorläuferzellen hervor, welche aus dem Blut einwandern (26,48).

1.1.2.1 Bone Lining Cells

Die Bone Lining Cells rechnet man zu den Vorläuferzellen, die als spindelförmige Zellen in einem Monolayer die inaktiven Teile der Knochenoberfläche bedecken. Sie machen ca. 94% der Knochenoberfläche aus. Der Rest besteht zu ca. 5% aus Osteoblasten und zu ca. 1% aus Osteoklasten (30).

Die Bone Lining Cells sind während des gesamten Lebens im Knochen vorhanden. Sie sind relativ undifferenziert und stoffwechselinaktiv (30). Sie haben die Eigenschaft, sich auf bestimmte Reize hin in Osteoblasten mit deutlich ausgeprägtem Syntheseapparat entwickeln zu können. Mechanische Belastung ist ein solcher Reiz, der dazu führt, dass sich Bone Lining Cells in aktive Osteoblasten umwandeln. In vivo konnte gezeigt werden, dass Bone Lining Cells und Osteozyten auf mechanische Belastung reagieren (28).

Reize können auch zwischen den Knochenzellen direkt vermittelt werden, da diese über lange Ausläufer durch Gap Junctions verbunden sind (22).

Bone Lining Cells werden vermehrt während des Wachstums aktiviert. Später können sie z.B. nach Knochenbrüchen zur Bruchheilung reaktiviert werden.

1.1.2.2 Osteoblasten

Osteoblasten gehen aus den Bone Lining Cells und auch direkt aus mesenchymalen Vorläuferzellen hervor. Sie haben selbst keine Fähigkeit mehr, die Zellteilung zu durchlaufen. Osteoblasten sind die stoffwechselaktiven Zellen des Knochens. Sie synthetisieren die organischen Teile der Knochengrundsubstanz und wirken auch bei der Bildung der Hartschubstanz mit. Osteoblasten bilden Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine. Sie liegen als einschichtiges Epithel auf der Oberfläche der Knochenbälkchen und geben ihre Syntheseprodukte in Richtung der Knochengrundsubstanz ab. Sie sind, wie die Osteozyten, ebenfalls über Gap Junctions verbunden (113). Als Zeichen ihrer hohen Syntheseaktivität sind die Osteoblasten, im Gegensatz zu den spindelförmigen Vorläuferzellen, kubisch bis hochprismatisch und haben einen deutlich ausgeprägten Syntheseapparat.

Die neugebildete, noch nicht verkalkte Knochengrundsubstanz wird als Osteoid bezeichnet. Dieser sogenannte Vorknochen lässt sich in der Mason-Goldner-Färbung histologisch unterschiedlich vom bereits verkalkten Knochen anfärben. Auf diese Weise lässt sich die Menge und Lokalisation von neugebildeter Knochengrundsubstanz bestimmen, was Rückschlüsse auf die Aktivität der Osteoblasten zulässt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Stimulation von aktiven Osteoblasten nicht ausreicht, um die Knochenmasse zu erhöhen. Hierfür muss es eine Interaktion zwischen Dehnungsreiz, Osteozyten, Vorläuferzellen und Osteoblasten geben (30).

1.1.2.3 Osteozyten

Osteoblasten wandeln sich in Osteozyten um, wenn die Osteoblasten sich vollständig mit Knochengrundsubstanz eingemauert haben und diese dann verkalkt. Der eingemauerte Osteoblast stellt die Proteinsynthese ein und beteiligt sich nur noch an der Regulierung des Kalzium- und Phosphathaushalts. Die Osteozyten stehen über lange zytoplasmatische Ausläufer mit anderen Osteozyten durch Gap Junctions in Kontakt (29,51). Diese dienen der Signal- und Nährstoffübertragung.

Es konnte gezeigt werden, dass Osteozyten eine Schlüsselrolle bei der Reaktion des Knochens auf mechanische Reize einnehmen.

1.1.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind große, stark verzweigte, mehrkernige Riesenzellen, die in der Lage sind, Knochengrundsubstanz abzubauen. Sie gehen vermutlich aus der Verschmelzung von aus dem Blut eingewanderten mononukleären Monozyten hervor. Aktive Osteoklasten bilden durch Abbau von Knochengrundsubstanz Einbuchtungen in den Knochen, sogenannte Howship Lakunen.

1.1.3 Interzellulärsubstanz

Die auch als Knochengrundsubstanz bezeichnete Interzellulärsubstanz besteht zu ca. 65% aus Mineralien, zu ca. 25% aus organischen Verbindungen und zu ca. 10% aus Hydratationswasser.

1.1.3.1 Mineralien

Die Mineralien der Grundsubstanz bestehen zu ca. 50% aus anorganischem Phosphat, zu ca. 35% aus Kalzium, zu ca. 6-7% aus Ziträt und Karbonat und zu geringen Teilen aus Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenelementen.

Die Mineralien liegen in Form von Apatitkristallen vor, wobei das Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) überwiegt. Die Anlagerung dieser Kristalle an und entlang der Kollagenfasern verleiht dem Knochen seine Festigkeit.

1.1.3.2 Organische Verbindungen

Kollagen-Typ-I stellt mit 90-95% den überwiegenden Teil der organischen Verbindungen im Knochen, die von den Osteoblasten synthetisiert werden. Den Rest machen Osteonektin, Osteokalzin, Osteopontin, sowie kleinere Proteoglykane und Glykosaminoglykane aus.

Osteonektin wird von Osteoblasten während der Knochenentwicklung und -regeneration synthetisiert. Es dient der Verbindung zwischen den Hydroxylapatitkristallen und Kollagen und spielt damit eine große Rolle in der Förderung der Knochenfestigkeit. Osteonektin fördert hierbei die Bildung von Kristallisationskeimen.

Osteopontin dient zum Einen der Verbindung der Hydroxylapatitkristalle mit den Knochenzellen, zum Anderen ist Osteopontin entlang der Knochenoberfläche aufgelagert und ermöglicht die Kontaktaufnahme der Osteoklasten mit der Knochenoberfläche. In-vitro konnte gezeigt werden, dass Osteopontin bei der Knochenresorption eine entscheidende Rolle spielt (4).

Die Hydroxylapatitkristalle umgeben sich mit einem Hydratmantel. Hieraus resultiert der Wassergehalt des Knochens.

1.1.4 Der histologische Bau von Knochen

Prinzipiell wird Geflechtknochen und Lamellenknochen unterschieden. Geflechtknochen entsteht bei der Neubildung von Knochen oder auch als Zwischenstadium bei der Bruchheilung. Charakteristisch für diese Art von Knochen ist der ungeordnete Lauf der Kollagenfaserbündel, welcher sich erst durch den Umbau in Lamellenknochen ändert. Lamellenknochen ist die für den Erwachsenen typische Art des Knochenaufbaus. Charakteristisch ist der klar strukturierte Aufbau aus Lamellen. Zentral liegt der Havers-Kanal, in welchem häufig die den Knochen versorgenden Gefäße und Nerven verlaufen.

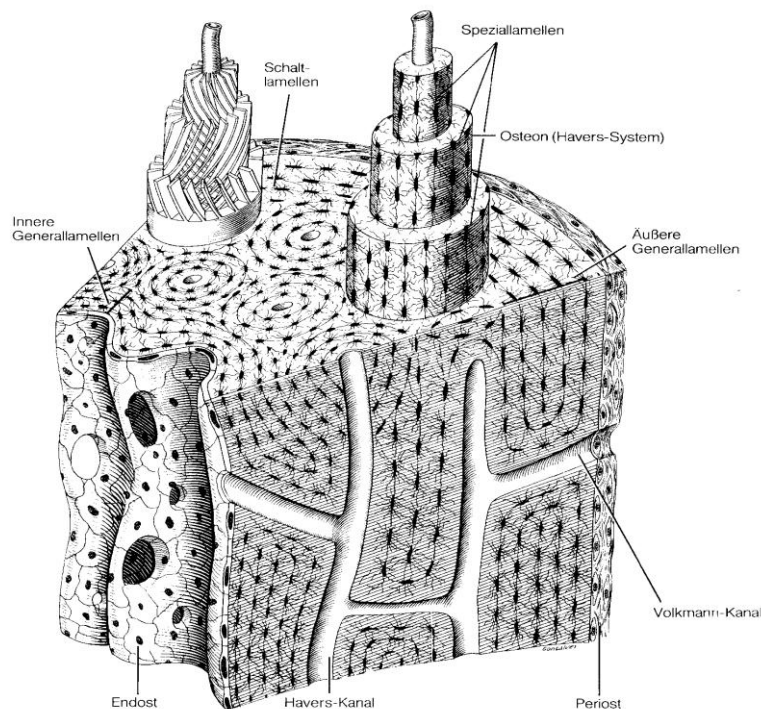


Abb. 1.1 Aufbau von Knochen; Darstellung der Lamellen
(aus Schiebeler-Schmidt – Anatomie – Springer 1997)

Konzentrisch um diesen Zentralkanal angeordnet liegen die einzelnen Lamellen, die schraubenförmig verlaufende Kollagenfaserbündel enthalten. Die Kollagenfaserbündel sind wiederum in Interzellulärsubstanz eingebettet. Zwischen den einzelnen Lamellen befinden sich Knochenhöhlen (Lacuna ossea), in denen sich die Osteozyten befinden. Diese Höhlen sind durch dünne Kanäle (Canaliculi Ossei), in denen die zytoplasmatischen Ausläufer der Osteozyten verlaufen, verbunden.

Eine solche Struktur wird als Osteon bezeichnet.

Knochen ist aus einer Vielzahl parallel angeordneter Osteone aufgebaut, die untereinander durch interstitielle Lamellen (Schaltlamellen) verbunden sind.

1.1.5 Funktioneller Bau von Knochen

Die streng parallele Anordnung der Osteone in den Diaphysen der langen Röhrenknochen ist in der Substantia Spongiosa der Epiphysen nicht so ausgeprägt. Dies liegt an der funktionellen Anpassung des Knochenbaus.

Der Aufbau der Osteone richtet sich nach den Trajektorien, den Hauptspannungslinien, die durch die Kräfte entstehen, welche auf den Knochen einwirken. Dies sind zum Einen Druckkräfte, die durch das Körpergewicht und die Schwerkraft entstehen, zum Anderen sind dies Zugkräfte durch die am Knochen ansetzenden Muskeln.

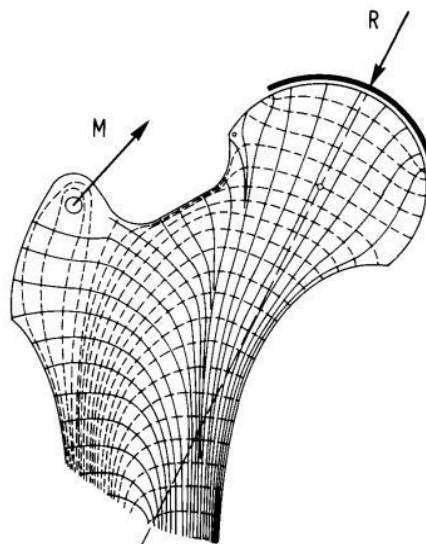


Abb. 1.2 Darstellung des proximalen Femurs mit Hüftkopf und Schenkelhals; eingezeichnet sind hier die Trajektorien, die durch die wirkenden Kräfte (R = Gewichtskraft und M = Muskelkraft) entstehen (aus Junqueira-Carneiro – Histologie – Springer 1996)

Die auf die langen Röhrenknochen der Beine wirkende Kraft ist größtenteils als eine einvektoriell einwirkende Gewichtskraft anzusehen. Die auf den Femurkopf und den Schenkelhals der menschlichen Hüfte einwirkenden Kräfte sind weitaus komplexer. Dies liegt am besonderen Bau des Hüftgelenks, welches dem Menschen einen sehr großen Bewegungsumfang erlaubt. Der Schenkelhals geht schräg vom Ende des Femurs ab. Dieser geht dann in den Femurkopf mit seiner großen Gelenkfläche über. Die Spongiosabälkchen sind entsprechend den Trajektorien ausgerichtet, um eine möglichst optimale Kräfteverteilung zu erreichen. Dies erklärt den komplexen Aufbau der Knochenbälkchen in der Substantia Spongiosa des Femurkopfes und Femurhalses.

1.2 Regulation des Knochenwachstums

Das Knochenwachstum und der Knochenumbau und der damit verbundene Auf- und Abbau des Knochens durch die Osteoblasten und Osteoklasten unterliegt einerseits systemischen und andererseits lokalen Regulationskreisläufen.

1.2.1 Systemische Regulation des Knochenwachstums

Die systemische Regulation des Knochenstoffwechsels wird von mehreren Hormonen geregelt. Dies sind hauptsächlich Calcitriol, Parathormon und Calcitonin. Sie regulieren in erster Linie den Kalzium- und Phosphatgehalt des Blutes.

Ein konstanter Kalziumspiegel im Blut ist sehr wichtig, da Kalzium als Second Messenger in fast jeder Körperzelle Verwendung findet. Auch die neuromuskuläre Funktion ist vom Kalziumspiegel abhängig. Ein Abfall von Kalzium kann zu Krämpfen führen, ein zu hoher Anstieg zu Übererregbarkeit. Ein durchschnittlich 70 kg schwerer männlicher Erwachsener besitzt ca. 1 kg Kalzium, wovon ca. 99% im Knochen gebunden ist. Nur ca. 1 g befindet sich im Blut. Dies soll zeigen, wie wichtig und genau das Zusammenspiel der folgenden Hormone sein muss.

1.2.1.1 Calcitriol

Calcitriol entsteht aus Vitamin D, welches einerseits in der Haut durch Sonnenbestrahlung aus 7-Dehydrocholesterol synthetisiert wird und andererseits mit der Nahrung aufgenommen wird.

Vitamin D wird zuerst in der Leber und dann in den Nieren zu 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ hydroxyliert. Dies ist die biologisch aktive Form, die auch Calcitriol genannt wird. Calcitriol steigert die Kalzium- und Phosphatabsorption im Darm und die Freisetzung aus dem Knochen. Der Kalzium- und Phosphatspiegel im Blut wird erhöht. Calcitriol aktiviert direkt Osteoklasten, welche dann vermehrt Knochen abbauen und Kalzium freisetzen. Vitamin D Mangel verursacht jedoch auch eine schlechtere Mineralisation des Knochens. Dieser widersprüchliche Effekt ist noch nicht vollständig verstanden.

1.2.1.2 Parathormon

Parathormon (PTH) ist ein Hormon aus der Nebenschilddrüse, das aus einer Kette von 84 Aminosäuren besteht. Eine erniedrigte Kalzium-Konzentration im Blut führt zur Ausschüttung von Parathormon. Calcitriol inhibiert die Transkription dieses Hormons. PTH seinerseits aktiviert die 1-Hydroxylase, die zur Bildung von Calcitriol beiträgt. Dies zeigt, dass hier ein Feedback-Mechanismus zwischen den beiden Hormonen besteht. Die Hauptwirkungsorte von PTH sind die Nieren und der Knochen. PTH stimuliert die Adenylatzyklase auf der gesamten Länge der renalen Tubuli, was zu einer proximalen Reduktion der Phosphat Reabsorption und zu einer Steigerung der distalen Kalzium Reabsorption führt. Am Knochen führt PTH zu einer längerfristigen Aktivierung der Osteoklasten und zu einer Erhöhung der Osteoklastenzahl. Osteoklasten besitzen selbst keinen Rezeptor für PTH. Zielzellen für PTH sind vermutlich die Osteoblasten, die ihrerseits Signale an die Osteoklasten vermitteln. Für diese Vermutung spricht, dass PTH in niedriger Dosierung zu einem Anstieg der Knochenmasse geführt hat (135).

Bei einem Versuch mit Rattenosteoblasten führte PTH zu einem Anstieg des gegenregulatorischen Proteins c-fos (19), welches zur Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten führt.

Eine Behandlung mit PTH und gleichzeitige Dehnung von Osteoblasten führte zu einer Umformung der Bone Lining Cells in aktive Osteoblasten (133).

Dies soll zeigen, dass PTH keine reine Abbaufunktion am Knochen hat, sondern aktiv an Umbauprozessen beteiligt ist.

1.2.1.3 Calcitonin

Calcitonin ist ein Peptidhormon aus 32 Aminosäuren, welches in den parafollikulären C-Zellen der Schilddrüse gebildet wird. Dieses Hormon wird bei hoher Kalzium Konzentration im Blut ausgeschüttet. Calcitonin inhibiert durch direkte Wirkung auf Osteoklasten die Resorption von Knochen. Gleichzeitig steigt die Zahl von Osteoblasten an.

1.2.2 Lokale Regulation des Knochenwachstums

Die lokale Regulation des Knochenstoffwechsels geschieht über eine Vielzahl von Faktoren, welche in sehr geringen Konzentrationen von den Knochenzellen spontan oder nach äußeren Reizen, wie z.B. Belastung, vermehrt gebildet und ausgeschüttet werden. Zu diesen Faktoren werden die Prostaglandine, die Zytokine und die Wachstumsfaktoren gerechnet, welche parakrin (in der Nähe ihres Produktionsortes) und auch autokrin (auf die Produktionszelle selbst) in pikomolaren Konzentrationen ihre Wirkung entfalten. In erster Linie wurden diese in fast allen Körpergeweben vorkommenden Faktoren in Bezug auf ihre Wirkungen im hämatopoetischen und immunologischen System charakterisiert.

Die Prostaglandine spielen auch bei der Kontraktion der glatten Muskulatur und bei der Entstehung von Fieber, Schmerz und Entzündung eine große Rolle.

1.2.2.1 Prostaglandine

Prostaglandine bilden zusammen mit den Prostacyklinen, Thromboxanen und den Leukotrienen die Gruppe der Eicosanoide.

Die Eicosanoide werden aus der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure gebildet. Arachidonsäure ist natürlicher Bestandteil der Phospholipide in Plasmamembranen und kann durch das Enzym Phospholipase A₂ aus diesen freigesetzt werden. Durch die Prostaglandinsynthase (Cyclooxygenase + Peroxidase) wird Arachidonsäure in Prostaglandin H₂ umgewandelt. Von hier führen verschiedene enzym-katalysierte Wege zu den Prostaglandinen, Thromboxanen und Prostacyklinen.

Durch die Umwandlung von Arachidonsäure mit Hilfe von Lipooxygenase entstehen die Leukotriene. Allgemein bekannte Wirkungen der Eicosanoide sind Kontraktion der glatten Muskulatur, Biosynthese von Steroidhormonen, Entzündungsmodulation, Schmerzentstehung, Thrombozytenaggregation und die Sekretion von Magensaft.

Prostaglandine sind in die Gruppen Pg A, Pg B, Pg E, Pg I, Pg F mit den Subtypen 1 – 3 eingeteilt.

1.2.2.2 Prostaglandin E2

In Bezug auf das Knochenwachstum nimmt Prostaglandin E2 (Pg E2) eine entscheidende Rolle ein. Pg E2 wird von Osteozyten und Osteoblasten nach äußeren Reizen, wie z.B. Belastung, freigesetzt (59,73,102). Reguliert wird die Pg E2 Produktion über die Aktivierung der zyklischen 3'5'AMP (cAMP). Prostaglandine können ihre eigene Wirkung potenzieren, indem sie ihre eigene Produktion über eine Aktivierung der cAMP steigern (94).

Pg E2 wird eine große Bedeutung in Bezug auf das Knochenwachstum beigemessen, jedoch sind die bisherigen Aussagen sehr widersprüchlich und bedürfen der weiteren Abklärung.

In vivo und in vitro Studien zeigten signifikante, aber sehr gegensätzliche Effekte von Pg E2 auf den Knochen auf. Exogen zugeführtes Pg E2 zeigte, abhängig von der Konzentration, einen stimulierenden (52,53,60,136) und einen inhibierenden Effekt (53,136) auf die Knochenformation in Ratten. In Zellkulturstudien, in denen der Effekt von Pg E2 auf die Knochenformation untersucht wurde, fand man ebenso einen stimulierenden und einen inhibierenden Effekt (85,100). Bezogen auf die Knochenresorption fand man ebenfalls eine stimulierende (85,87) und eine inhibierende Wirkung von Pg E2 (35,87).

Ungeachtet der widersprüchlichen Ergebnisse belegen die bisherigen Studien die wichtige Rolle von Pg E2 in Bezug auf den Knochenstoffwechsel, egal ob Pg E2 exogen zugeführt oder durch mechanische Stimuli erhöht wurde (94,146). Die Höhe des Pg E2 Levels beeinflusst vermutlich direkt die Knochenumbildung durch eine Stimulation der Osteoblasten, Osteoklasten und/oder deren Vorläuferzellen.

Welche Zellart bei welcher Prostaglandin Konzentration stimuliert wird, ist momentan noch in der Diskussion. Man muss davon ausgehen, dass die Knochenzellen sich gegenseitig, durch von ihnen freigesetztes Prostaglandin, stimulieren. Ergebnisse von Zellkulturexperimenten lassen vermuten, dass Zelldehnung durch mechanische Belastung (Strain) oder Scherkräfte durch Flüssigkeitsbewegung innerhalb des Knochens (Fluid Flow) die Freisetzung von Fettsäuren aus der Zellmembran induzieren und damit die Produktion von Prostaglandinen ermöglichen (3,112,146).

Mechanische Belastung von Knochenzellen durch Dehnung in Kultur führte zu einem erhöhten Pg E2 Spiegel im Zellkulturmedium (57,81).

Osteoblasten, welche mit einem erhöhten Scherdruck in Flusskammern kultiviert wurden, zeigten einen Anstieg der Pg E2 Synthese proportional zum Anstieg des Scherdrucks (103,141).

In Kultur gehaltene Ulnaschäfte von 110 g schweren männlichen Ratten wurden einerseits chemisch, andererseits mechanisch behandelt. Exogen zugeführtes Pg E2 führte genauso wie zyklische mechanische Belastung zu einem Anstieg von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD). Dies zeigte einen Anstieg der Syntheseaktivität an.

Gleichzeitig konnte der Einbau von exogen zugeführtem (^3H) Prolin in das Kollagen der Rattenulnae beobachtet werden (18).

Die Methoden, mechanische Belastung von Knochenzellkulturen, Organkulturen oder dem gesamten Organismus durchzuführen, mögen variieren, aber die daraus folgenden Reaktionen gleichen sich:

Wenn Knochenzellen belastet werden, entsteht ein Anstieg des Zellmetabolismus, der Zellproliferation und des Levels von Pg E2 proportional zur aufgebrachten Belastung. Zusammen mit dem Anstieg von Pg E2 steigt auch die Produktion von cAMP und IGF (56,94,96,102,103).

1.2.2.3 Zytokine

Eine weitere Gruppe von lokalen Mediatoren, die sowohl im normalen als auch im pathologischen Knochenstoffwechsel eine entscheidende Rolle einzunehmen scheinen, sind die Zytokine.

Zytokine sind hormonähnliche Peptide und Proteine, meistens Glykoproteine, mit einem Molekulargewicht unter 60000 Dalton, meist unter 20000 Dalton. Sie werden lokal produziert und sind bereits in pikomolaren Konzentrationen wirksam. Aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit von Sekunden bis Minuten und ihrer sehr geringen Konzentration sind sie fast nur in der Nähe ihres Produktionsortes wirksam. Es existieren spezifische Rezeptoren für Zytokine an den Zielzellen. Die Bindung eines Zytokins an seinen spezifischen Rezeptor führt über mehrere Stufen zu einer Aktivierung der Transkription spezifischer Gene. Wirkungen in und an der Zielzelle sind z.B. die Freisetzung weiterer Mediatoren, die Expression von Differenzierungsmolekülen und die Regulation der Expression verschiedener Zelloberflächenmoleküle (1).

Anfänglich wurden die Zytokine aufgrund ihrer Wirkungen auf das hämatopoetische und immunologische System charakterisiert.

Ihre biologischen Aufgaben lassen sich grob in drei große Bereiche aufteilen:

- Entwicklung und Homöostase des Immunsystems
- Kontrolle des blutbildenden Systems
- Steuerung der unspezifischen Abwehr durch die Beeinflussung von Entzündungsprozessen, Blutgerinnung und Blutdruck

Allgemein kontrollieren Zytokine das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Zellen.

Je nach Ursprung der Zytokine ist die Nomenklatur unterschiedlich.

Monokine werden Zytokine genannt, welche von Monozyten oder Makrophagen produziert werden.

Lymphokine werden Zytokine genannt, welche von Lymphozyten freigesetzt werden.

Interleukine werden Zytokine genannt, die hauptsächlich Zellinteraktionen beeinflussen.

Bezüglich ihrer Funktion können die Zytokine folgendermaßen zusammengefasst werden:

Entzündungsfördernd: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β

Entzündungshemmend: IL-10, IL-13, TGF- β

Hämatopoese fördernd: G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-7

Immunregulatorisch: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN- γ , TGF- β

Anti-infektiös: IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α

Anti-proliferativ: IFN- γ , TNF- α , TGF- β

Einer Reihe von Zytokinen wird auch in Bezug auf den Knochenstoffwechsel eine entscheidende Rolle beigemessen.

Sie werden spontan sowie auf bestimmte Stimuli (chemisch und/oder mechanisch) hin im Knochengewebe freigesetzt.

Diese sind im Einzelnen:

IL-1 (Osteoclasts activating factor = OCAF)

IL-4, IL-6, IL-8, IL-10

IFN- γ

Lymphotoxin

MCP-1, MCP-2

TNF

Die folgenden Zytokine wurden in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

1.2.2.4 Interleukin 6 (IL-6)

Interleukin 6 (IL-6) gehört zusammen mit Interleukin 11 (IL-11), Leukämie Inhibitor Faktor (LIF), Onkostatin M (OSM), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) und Cardiotropin 1 (CT-1) zu einer Subpopulation multifunktionaler Zytokine, die ihren biologischen Effekt über eine Aktivierung derselben Signaltransduktionskette erzielen. Diese Gruppe wird als sogenannte IL-6-type-cytokines bezeichnet (114).

Die Zytokin Rezeptoren besitzen selbst keine für die Signaltransduktion wichtige Tyrosin-Kinase Aktivität. Hierfür werden Helferproteine, sogenannte Signaltransduktionsproteine (STP), benötigt. Zytokin-Rezeptoren der Klasse I interagieren mit drei verschiedenen Typen von STP, den Proteinen gp 130, βc , γc .

Nach der Bindung von Zytokin an seinen spezifischen Rezeptor assoziieren sie mit sich selbst zu Homodimeren oder mit anderen STP zu Heterodimeren. Diese fördern die Dimerisierung der STP, welche dann das Signal an Tyrosin-Kinasen weiterleiten. Da unterschiedliche Zytokine über ihren Rezeptor die gleichen STP aktivieren können, erklärt sich hier die teils überlappende biologische Aktivität einiger Zytokine.

IL-6, IL-11 und CNTF binden an Rezeptoruntereinheiten, die das entsprechende Zytokin erkennen, aber nicht direkt an der Signaltransduktion teilnehmen. Dies ist die α Untereinheit des Rezeptors (42,61,125). Die Bindung an die α Untereinheit führt zur Bindung an die β Untereinheit. Zytokine können aber auch direkt an die β Untereinheit binden.

Unabhängig davon, an welche Rezeptoruntereinheit ein Zytokin bindet, führt dies zur Dimerisierung des Signaltransduktionsproteins (STP) gp 130 (Glycoprotein 130). Das dimere Membranprotein gp 130 bindet cytoplasmatische Tyrosin-Kinasen der JAK-Familie, sogenannte Janus-Kinasen mit zwei Kinase-Zentren, und aktiviert diese (61).

Die Janus-Kinasen phosphorylieren Zytokin-Rezeptoren, STP, verschiedene cytoplasmatische Proteine und Transkriptionsfaktoren, welche als STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) bezeichnet werden (32).

STAT gehören zu den Proteinen mit einer SH₂-Domäne, die Phosphotyrosin-Reste binden können. STAT binden daher an die von den Janus-Kinasen phosphorylierten Zytokin-Rezeptoren. Wenn die STAT dann selbst phosphoryliert werden, gehen diese in ihre aktive Form über und bilden Dimere.

Nach ihrem Transfer in den Zellkern binden sie als Transkriptionsfaktoren an die Promotoren induzierbarer Gene und steuern so deren Transkription (32,69).

Die Hauptfunktion von IL-6 besteht in seiner Fähigkeit Osteoklasten-Vorläuferzellen zu stimulieren. IL-6 wird auch als Osteoklasten-stimulierender-Faktor (OSF) bezeichnet (105,106).

Systemische Hormone, wie z.B. PTH, Vit. D, T₃/T₄, die den Knochenstoffwechsel direkt beeinflussen, wirken auch indirekt auf die Produktion von IL-6 ein (5,25,54).

IL-6 unterstützt zusammen mit IL-3 die Produktion von CFU-GM (Colony Forming Units Granulocytes/Macrophages) und stimuliert die Differenzierung von frühen Osteoklasten-Vorläuferzellen aus CFU-GM (70).

Auch die Ausbildung von reifen Osteoklasten und die Resorption von Knochen „in vivo“ wird in Zusammenarbeit mit IL-1 durch IL-6 stimuliert.

IL-6 scheint keinen Effekt auf die Knochenresorption in Neugeborenen-Calvaria zu haben, welche einen hohen Anteil an Osteoklasten-Progenitor-Zellen und relativ wenige myeloische Progenitor-Zellen besitzen (2). In Kombination mit seinem löslichen Rezeptor stimuliert IL-6 Osteoklasten (123). IL-6 scheint jedoch keine Rolle in der Entwicklung von Osteoklasten-Progenitor-Zellen im Knochenmark zu spielen (54).

Bei der Untersuchung von 29 Patienten mit Prothesen, die sich einer Revisionsbehandlung aufgrund von Prothesenlockerung unterziehen mussten, wurde periprotetisches Gewebe hinsichtlich des Zytokinmusters immunhistochemisch untersucht. Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß von

Osteolysen und der Expression von IL-1 α und β , IL-6 und TNF- α gefunden. Osteoblasten wurden mit mononuklearen Phagozyten, die mit Abriebpartikeln inkubiert worden waren, in Kontakt gebracht. Sie produzierten daraufhin vermehrt IL-6 und Pg E2 (120).

Es ist jedoch unklar, ob IL-6 seinen Einfluss auf die Osteoklasten-Genese über Rezeptoren auf Osteoklasten-Progenitor-Zellen oder über Rezeptoren auf Osteoblasten ausübt.

Möglicherweise erfolgt die Signalübertragung über beide Wege.

1.2.2.5 Tumornekrosefaktor (TNF)

TNF gehört ebenso wie IL-1 zu einer Familie, die aus zwei verwandten Polypeptiden (α und β) besteht. TNF α und β haben eine ähnliche biologische Aktivität und sind potente Stimulatoren der Knochenresorption (6,76,105).

TNF und IL-1 inhibieren die Osteocalcin- und Typ-1 Kollagenbildung in Osteoblasten (16,107). Die Knochenresorption wird von TNF einerseits über die gesteigerte Rekrutierung von Osteoklasten (55) und andererseits über die Beschleunigung der Ausbildung von Osteoklasten-ähnlichen-Zellen und deren Differenzierung gesteuert (93). Die Wirkung von TNF und IL-1 auf die Knochenresorption durch Stimulation von Osteoklasten lässt sich nur in Anwesenheit von Osteoblasten nachweisen. In reinen Osteoklasten-Kulturen lassen sich keine Effekte durch TNF oder IL-1 nachweisen (130). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Wirkung von TNF nicht direkt die Osteoklasten betrifft, sondern über andere Zellen reguliert wird.

TNF- α wird von Osteoblasten-ähnlichen-Zellen produziert und die Ausschüttung durch IL-1, GM-CSF und Lipopolysaccharid stimuliert.

Es existieren verschiedene Rezeptoren für TNF, der TNF-Rezeptor-1 (p55) und der TNF-Rezeptor-2 (p75) (118). Im Gegensatz zu IL-1 haben hier beide Rezeptoren eine biologische Aktivität. Vermutlich besteht zwischen beiden Rezeptoren eine Interaktion und es bedarf für eine Vielzahl von Rezeptor-Antworten einer Aktivierung beider Rezeptoren (138). Manche Effekte werden aber auch durch die selektive Aktivierung eines einzelnen Rezeptors vermittelt (116).

TNF zeigt neben der knochenresorptiven Wirkung, ähnlich dem IL-1, auch eine inhibitorische Wirkung auf die Knochenneubildung (6).

Es konnte auch eine Verbindung zwischen Abriebpartikeln von Endoprothesen und der Stimulation der Knochenresorption mit erhöhten Spiegeln von TNF und IL-1 nachgewiesen werden (41,46,115,120).

1.2.2.6 Osteoprotegerin

Osteoprotegerin, auch Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) genannt, ist ein Glykoprotein, welches 1997 als ein Angehöriger der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie identifiziert (TNF-R) wurde (14,145).

Es handelt sich um einen löslichen Rezeptor, der von verschiedenen Geweben gebildet wird und als "decoy receptor" die Interaktion zwischen RANK und RANKL und damit die Schritte der Rekrutierung, Proliferation und Aktivierung der Osteoklasten blockiert. Die daraus resultierenden biologischen Effekte von OPG stellen das Gegenteil derer von RANKL dar, welches die Osteoklastentätigkeit fördert. Weiterhin ist OPG in der Lage, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) zu binden und so die durch diesen Liganden induzierte Apoptose zu unterbinden. Somit wirkt OPG als potenter Inhibitor des Knochenabbaus (14,78,131,145). Tierversuche an transgenen Mäusen haben gezeigt, dass es bei einer Überexpression von OPG zu einer Osteopetrose kommt, und dass das Glykoprotein zudem vor einem konsekutiven Knochenverlust nach einer Ovarioektomie schützt.

Die Expression und Regulation von OPG wird durch verschiedene Zytokine, Peptide, Hormone und Medikamente beeinflusst. Sowohl Zytokine, wie TNF- α , Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-18, TGF- β (transforming growth factor β), BMP (bone morphogenetic protein) als auch Steroidhormone, wie z.B. das Östradiol-17 β , steigern die mRNA-Expression von OPG (8,21,44,129,140,142). Auch mechanische Kräfte, die auf die Knochenoberfläche einwirken, stimulieren die OPG Expression (66). Im Gegensatz dazu verursachen Glukokortikoide, das Zyklosporin A, Parathormon (PTH), PGE2 und FGF (fibroblast growth factor) eine Suppression der OPG-Produktion (9,43,45,84,88,139).

RANK (Receptor activator of NF- κ B) wird an der Oberfläche von Zellen der Osteoklastenlinie (Vorläuferzellen und reife Osteoklasten), der entsprechende Ligand RANKL (Osteoclast differentiation factor = ODF; Osteoprotegerin ligand = OPGL) an der Oberfläche von Präosteoblasten expremiert (122). Bei einem aktiven

Remodeling ist RANKL immer anzutreffen (71). Neben den Präosteoblasten produzieren aber auch aktivierte T-Zellen RANKL.

Verschiedene Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , aber auch Glukokortikoide und PTH (67) modulieren die Expression von RANKL. Durch Bindung von RANKL an seinen spezifischen Rezeptor RANK wird dieser stimuliert (38,47,82,83). Infolge einer dadurch intrazellulär ausgelösten Signalkaskade (108) kommt es zu einer Osteoklastenformation, -fusion, -differenzierung (71,77,145) und -aktivierung (13,36,71). Zum anderen wird die Apoptose der Osteoklasten gehemmt (36). Dies führt zu einer progressiven Knochenresorption und damit zum Knochenabbau (68,71). Folglich nimmt das Zytokinnetzwerk aus RANKL, OPG (beides parakrine Mediatoren) und RANK eine Schlüsselrolle in der Regulation des Knochenmetabolismus und der Osteoklasten-Biologie ein.

1.3 Knochenumbau

Das Knochengewebe wird permanent umgebaut. Der zeitlich und örtlich koordinierte Ablauf von Knochenabbau durch die Osteoklasten und Knochenneubildung durch die Osteoblasten sorgt dafür, dass die Knochenstruktur erhalten bleibt und sich dauernd an die wechselnde biomechanische Beanspruchung des Skeletts anpassen kann. Die mit dem Knochenumbau zusammenhängende Freisetzung und Speicherung von Knochenmineralien ist zudem für die Regulation des Calcium-Phosphat-Haushalts von großer Bedeutung.

Änderungen der mechanischen Belastung oder des Calcium-Phosphat-Haushalts werden vom Knochengewebe durch gezielte Umbauvorgänge beantwortet. Dieser gezielte Knochenumbau wird auch „Remodeling“ genannt.

Bereits 1892 postulierte Wolff das „Gesetz der Transformation der Knochen“, welches den Einfluss mechanischer Belastung auf den Knochenbau beschreibt (143). Auch wenn viele seiner Schlüsse fehlerhaft waren (30), konnte die Feststellung Wolff's, dass sich Knochen durch Umbau an geänderte Belastungsbedingungen anpasst, bestätigt werden und wurde als „Wolffs Gesetz“ bekannt.

Die Belastung von Knochen führt zu dessen Verformung. Diese Verformung kann als Längenänderung in Bezug auf die Gesamtlänge des Knochens ($\Delta L/L$) angegeben werden und wird als Strain bezeichnet. Mechanische Belastung führt somit zu Strain innerhalb des Trabekelwerks von spongiösem Knochen. Werte von 1000 – 4000 μ strain können als physiologischer Bereich angesehen werden, der zu einem vermehrten Knochenumbau führt (34,91,132).

Vieles spricht dafür, dass die Osteozyten hauptsächlich für die mechanosensitiven Eigenschaften des Knochens verantwortlich sind (11,23,72,92,109,111,117). Die Osteozyten sind über Osteopontin, Fibronectin und Kollagen-Typ-I direkt mit der sie umgebenden Matrix verbunden. Dadurch wird eine Verformung des Knochens auch direkt auf die Osteozyten übertragen.

Eine andere Vermutung ist, dass durch die Verformung der Knochenmatrix eine Flüssigkeitsverschiebung innerhalb des Lakuno-Kanalikulären-Systems stattfindet, wodurch flüssigkeitsinduzierte Scheerkräfte auf die Osteozyten einwirken (11,12,64,103,121). Viele Autoren sehen hier den Hauptweg der Mechanotransduktion.

Der Flüssigkeitsstrom und die Druckverteilung innerhalb des Knochens sind abhängig von der Architektur und Porosität der Trabekelstruktur (27).

Unabhängig von der Art der mechanischen Stimulation der Osteozyten führt diese zu einer vermehrten Produktion von IGF-I (75). IGF-I bewirkt, dass sich die normalerweise flach der Knochenoberfläche aufliegenden Bone-Lining-Cells zusammenziehen und abrunden. Die Bone-Lining-Cells liegen auf einem dünnen Osteoidsaum (137), der die Knochenmatrix vor Resorption durch die Osteoklasten schützt (17). IGF-I bewirkt zusätzlich, dass die Bone-Lining-Cells Kollagenasen produzieren, welche die Knochenmatrix freilegen. Die offenliegende Knochenmatrix wirkt chemotaktisch auf Osteoklasten-Vorläuferzellen. Diese lagern sich an die Knochenmatrix an und wandeln sich zu Osteoklasten um, welche wiederum IL-6 produzieren, um weitere Osteoklasten in dieses Gebiet zu führen (5,123). Gleichzeitig lagern sich auch Osteoblasten dort an.

Diese lokale Ansammlung von Osteoklasten und Osteoblasten und deren Vorläuferzellen findet sich an vielen verschiedenen Stellen des Knochens gleichzeitig und stellt die kleinste funktionelle Einheit des Knochenumbaus dar. Diese Einheiten werden BMU (Basic Metabolic Unit) genannt (90).

Entsprechend der größeren Aktivität der Osteoklasten oder der Osteoblasten findet ein vermehrter Abbau oder Aufbau des Knochengewebes statt.

Die Arbeitsweise einer BMU verläuft immer nach dem gleichen Prinzip:

Die angelagerten Osteoklasten beginnen mit dem Abbau der Knochenmatrix und bilden eine Aushöhlung, eine sogenannte Howship-Lakune (40,50,89). Die Tiefe einer solchen Howship-Lakune ist von der Lebensdauer der Osteoklasten und der Neurekrutierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen abhängig. Meist erreichen sie eine Tiefe von 50 – 100 µm.

Darauf folgt eine Ablagerung von Osteoblasten am Boden der Lakune, die dann beginnen neues Osteoid zu bilden (31). Die Mineralisation des Osteoids führt so zu neuem Knochengewebe. Die Aktivität der Osteoblasten entscheidet nun, ob mehr oder weniger neues Knochengewebe gebildet wird, als zuvor vorhanden war.

Einige der Osteoblasten mauern sich in der Lakune mit Osteoid ein und wandeln sich im Laufe der Mineralisation in Osteozyten um. Andere Osteoblasten flachen nach Beendigung der Osteoidproduktion auf der Knochenoberfläche ab und werden zu Bone-Lining-Cells.

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich Bone-Lining-Cells durch Strain selbstständig zu Osteoid produzierenden Osteoblasten umwandeln können (7,92). Dies erklärt den gleichzeitigen Abbau von Knochen auf einer Trabekelseite und den Aufbau von Knochen auf der anderen Seite.

Weil aber viele Mechanismen bisher unverstanden blieben, wurden diverse Modelle entwickelt, um den Einfluss von mechanischer Belastung auf den Knochenumbau zu erforschen.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass ab einer Belastung von 1000 μ Strain Osteoblasten aktiviert werden. Eine gesteigerte Belastung führte auch zu einem vermehrten Knochenumbau.

Die dynamische Belastung von Pins, die in die Ulna von Truthähnen eingesetzt wurden, führte zu einer Hypertrophie des Knochens direkt proportional zur applizierten Belastung (110).

Mit einem 4-Punkt-Dehnungsapparat, der auf die Tibia von Ratten angewendet wurde, konnte eine Belastungsschwelle von 1050 μ Strain für die Aktivierung von Osteoblasten nachgewiesen werden (132). Gleichzeitig konnte ein gesteigerter Zellmetabolismus anhand von gesteigerter mRNA Produktion nachgewiesen werden (95).

Die Untersuchung der Bruchfestigkeit der Tibia von Hennen, die für 8 Wochen, 5 Tage die Woche, in einer Tretmühle laufen mussten, ergab, dass die Bruchfestigkeit um 12% – 16% im Vergleich zur unbelasteten Gruppe gestiegen war. Der Mineralisationsgrad der belasteten Gruppe unterschied sich nicht von der unbelasteten Gruppe. Dies zeigt, dass sich die Umbauprozesse innerhalb des Knochens nicht alleine auf die Quantität, sondern auch auf die Qualität der Knochenstruktur auswirken.

Die Untersuchung der Mineralisationsdichte von humanem Knochen (24,37,86,119) und tierischem Knochen (97,134) ergab, dass eine hinreichende Belastung durch Gewichtstragen oder -heben zu einem Rückgang des altersspezifischen Knochensubstanzverlusts und zu einer Erhöhung der Knochenmasse führt.

Die polychrome Sequenzmarkierung mittels den Fluochromen Tetrazyklin, Calcein oder Alizarin in vivo kann zu einer Abschätzung von Ort, Zeit und Umfang von knöchernen Umbauprozessen genutzt werden. Die Fluochrome bilden mit Kalzium Chelatkomplexe (79), die sich entlang der Mineralisationsfront einlagern (98,99,124).

In einem in vivo Beckenkammbiopsieversuch an 34 postmenopausalen Frauen nach einem doppelten Tetrazyklin Labeling konnte eine MAR (Mineral Apposition Rate (Mineralisationsrate)) von 0,5 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ beschrieben werden (101).

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung der Reaktion von Knochen auf mechanische Belastung ist die Zellkultur. Hier wird nur eine einzige Zellart, meist Osteoblasten oder Osteozyten, kultiviert und mittels verschiedener Methoden belastet.

In vielen Modellen wurden die Zellkulturen hydrostatisch belastet (12,64,146). Hier wurde besonders großer Wert auf die Beobachtung der Mediatorenausschüttung gelegt.

Beim Vergleich der PgE2 Ausschüttung von Osteoblasten und Osteozyten, die mittels pulsierender Strömung hydrostatisch belastet wurden, konnte gezeigt werden, dass Osteozyten schneller und vermehrt auf die Belastung reagieren (64).

In Zellkultur wurde auch die Mechanosensitivität in Abhängigkeit vom Lebensalter untersucht. Die Zellen von 39 Spendern im Alter von 7 – 85 Jahren wurden kultiviert und mit einem Druck von 0,7 Pa über eine Stunde mit einer Frequenz von 5 Hz hydrostatisch belastet. Alle Zellen reagierten auf die Belastung mit einer gesteigerten PgE2 und PgI2 Ausschüttung. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen von älteren Individuen zwar eine geringere Proliferationsrate aufweisen, es jedoch keinen Hinweis darauf gibt, dass es zu einem Verlust der Mechanosensitivität im Alter kommt (63).

Auch ganze Organkulturen wurden mechanisch belastet. Mäusekalvarienknochen wurden in-vitro durch Kompression der Gasphase intermittierend belastet. Eine Steigerung der MAR und eine Verminderung der Aktivität der Osteoklasten konnte nachgewiesen werden (65).

Allgemein zeigte sich, dass nur dynamische Belastungen zum Remodeling führen. Statische Belastungen haben eher anabole Effekte auf den Knochen (12,111).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aussagekraft eines jeden Versuchsmodells hinterfragt werden muss.

Im Tierversuch besteht die Schwierigkeit konstante und kontrollierte Kulturbedingungen für den Knochen zu schaffen. Zur Änderung von Regelgrößen muss immer in ein komplexes Organsystem eingegriffen werden. Der tierische und menschliche Organismus unterliegt verschiedensten Einflüssen, was die Gewährleistung von konstanten und reproduzierbaren Bedingungen fast unmöglich macht.

In den Zellkulturverfahren wird nur eine einzelne Zellart beurteilt und es fehlt die Interaktion zwischen allen Zellen, die normalerweise im Knochen vorhanden sind. Daher ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den gesamten Knochen schwierig. Bei der Kultur von ganzen Organproben muss darauf geachtet werden, physiologische Bedingungen zu schaffen, in denen es möglich ist, den Knochen lange genug am Leben zu halten.

Hierfür ist ein Kultursystem notwendig, in dem ganze Organproben von trabekulärem Knochen unter physiologischen Bedingungen kultiviert und belastet werden können. Bei der Belastung sollten Kraft und Kompression in Echtzeit gemessen werden können. Weiterhin sollte die Möglichkeit gegeben sein, die anfallenden Mediatoren entnehmen und messen zu können.

Ein solches System wurde unter dem Namen „ZETOS“ von Prof. Dr. D.B. Jones und Prof. Dr. E.L. Smith im Fachbereich Experimentelle Orthopädie der Philipps-Universität-Marburg entwickelt. In zahlreichen Vorversuchen an überwiegend bovinem Knochen wurden die Kultur- und Belastungsbedingungen erprobt und verfeinert.

Die vorliegende Arbeit diene der Untersuchung der Langzeitkulturmöglichkeiten von humanem Knochen in diesem System. Zusätzlich sollte die Frage geklärt werden, ob durch verschiedene Belastungsstimuli messbare Mediatorenausschüttungen induziert werden können. Die histologische Aufarbeitung der Knochenproben am Ende des Versuchs sollte klären, ob die Belastung der Knochenproben zu morphologischen Änderungen geführt hat, welche auch quantitativ erfassbar sind.

2 Material & Methoden

2.1 Das ZETOS-System

Ein präzises mechanisches Belastungs- und Messsystem kombiniert mit einer Kultur- und Belastungskammer für trabekuläre Knochen wurde von Prof. Jones und Prof. Smith in der Abteilung für experimentelle Orthopädie der Philipps-Universität Marburg entwickelt, welches die Möglichkeit der Studien an Knochen unter kontrollierten Kultur- und Belastungsbedingungen ex vivo erlaubt.

Das Belastungssystem kann hierbei in zwei Modi arbeiten. Es kann entweder eine definierte Kompression oder eine definierte Kraft auf die Knochenprobe ausgeübt werden. Die jeweils andere Größe stellt die Unbekannte dar, welche in Echtzeit während der Belastung gemessen wird.

Zurzeit können Proben im Frequenzbereich von 0,1 – 50 Hertz (Hz) dynamisch stimuliert werden. Die Genauigkeit der Kompression liegt bei $\pm 0,5 - 1,5 \mu\text{m}$.

Das System erlaubt Messungen und Berechnungen der mechanischen Eigenschaften des untersuchten Gewebes.

Ein piezo-elektrischer Aktuator (PEA) kann sowohl quasi-statische Belastungen, als auch eine Vielzahl periodischer Oszillationsmuster erzeugen. Hierbei können Belastungsmuster wie beim Laufen oder Springen simuliert werden, während simultan Kraft und Kompression gemessen werden. Diese beiden Größen werden zur Berechnung der scheinbaren Steifigkeit der Knochen benutzt. Die Änderungen dieses physikalischen Parameters können über die Zeit untersucht werden, während sich der Knochen in Kultur befindet.

Für konstante und kontrollierte Kulturbedingungen sorgt ein geschlossener Mediumkreislauf, an den die Kultur- und Belastungskammer angeschlossen ist. Aus dem Kulturmedium können jederzeit Proben zur Bestimmung von Mediatoren entnommen werden.

Das komplette System ist unter dem Namen ZETOS bekannt. Es wurden bereits Arbeiten über die technischen Details des Systems (10) sowie über Langzeitknochenkulturen veröffentlicht (62).

(United States Patent 6. July, 1998, No. 6.171.812; Everett L. Smith, David Jones: Combined perfusion and mechanical loading system for explanted bone / United

States Patent 19. March, 2002, No. 6.357.303 B2; Everett L. Smith, David Jones: Mechanical Testing Device)

2.1.1 Das Belastungssystem

Die Belastungseinheit des ZETOS-Belastungssystems besteht aus einem Rahmen von Stahlbolzenschrauben, verbunden mit einem Aluminiumgehäuse und jeweils einer oberen und unteren Endplatte aus Stahl. Ein Schraubsystem bewegt die Belastungseinheit, bestehend aus dem Kraftsensor (Kistler, Schweiz) und dem piezo-elektrischen Aktuator (PEA) (Physik Instrumente, Deutschland), nach oben und nach unten. Durch manuelle Bedienung des Schraubsystems kann eine geringe statische Vorlast auf die Knochenzylinder ausgeübt werden. Dies bringt die Linse des PEA in Kontakt mit dem Belastungs-Piston der Kultur- und Belastungskammer. Das Gerät ist mit Dehnungsmessstreifen versehen, welche ermöglichen, dass präzise Messungen der Ausdehnung des Gerätes ermittelt werden können.



Abb. 2.1 Belastungseinheit mit Kultur- und Belastungskammer

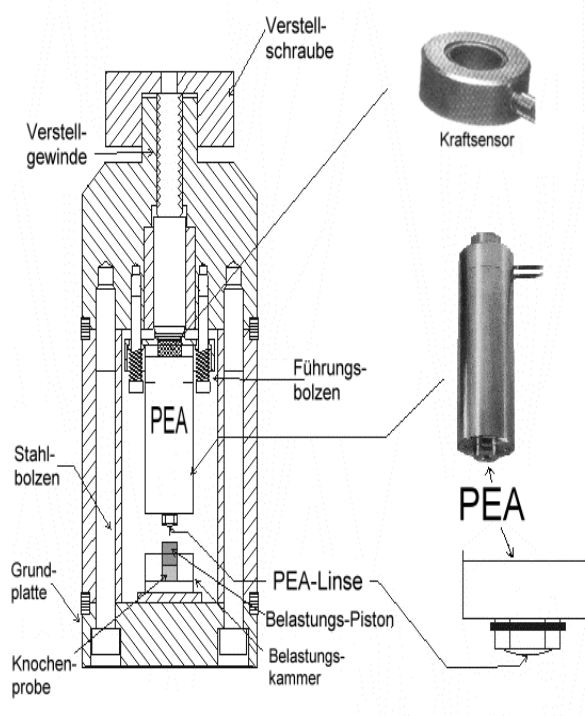


Abb. 2.2 Aufbau der Belastungseinheit

Der PEA besteht aus einem Stapel von Piezo-Kristallen, welche in einem wasserresistenten Mantel eingebettet sind. Er kann eine Kraft von bis zu 4500

Newton ausüben, wobei das Maximum der PEA Ausdehnung von der Art der Belastungsapplikation abhängt.

Während des dynamischen Arbeitsvorgangs korreliert die Amplitude der Expansion mit der Frequenz des Arbeitsvorgangs in Kombination mit der Resonanzfrequenz des PEA. Diese steht wiederum in Verbindung mit der effektiv schwingenden Masse, der Viskoelastizität und der Steifigkeit des Knochens.

Die untere Kontaktoberfläche des PEA ist mit einer Saphir Plan-Konvexen Linse (Kyrburz AG, Schweiz) versehen. Die kugelförmige Natur der Linse erlaubt eine adäquate Adaption an die zu belastende Knochenoberfläche, die möglicherweise nicht zu hundert Prozent planparallel ist, und verhindert somit das Auftreten einer Biegebelastung innerhalb des Kristall-Stempels.

Ein Hochspannungsverstärker (Physik Instrumente, Deutschland), dessen Eingang mit einem Analogausgang der Mikrokontroller-Schaltung verbunden ist, aktiviert den PEA.

Zusammen mit dem für den ZETOS programmierten Windows Benutzerprogramms ist es möglich, eine quantifizierte Kompression oder eine quantifizierte Kraft innerhalb der Kultur- und Belastungskammer auf die Knochenzylinder wirken zu lassen.

Der Mikrokontroller und das damit verbundene elektronische System sowie die Sensoren arbeiten unabhängig von dem Betriebssystem des PCs. Die Echtzeit-Messdaten der Ausdehnung des PEA und die auf die Knochenzylinder einwirkende Kraft werden erfasst und anschließend abgespeichert.

Die Kultur- und Belastungskammer (KBK), in welcher der Belastungskolben (Piston) abgedichtet ist, ist mit einem X-Ring (Basag & Shamban S.A. Crissier, Schweiz) versehen. Er erlaubt eine Anpassung an eine nicht vorhandene Parallelität von bis zu 50 μm . Durch die präzise Aufarbeitung der Knochenzylinder muss jedoch nur mit einer Rauigkeit und Nicht-Parallelität von maximal 2 μm gerechnet werden.

Ein Hochspannungs-Piezo-Aktuator-Verstärker (Physik Instrument, Deutschland), welcher eine Kapazität von 0 – 1000 Volt aufweist, steuert den PEA. Er besitzt ein eigenes Netzteil und wird über den Mikrokontroller des elektronischen Systems ein- und ausgeschaltet.

Der Piezo-Kraftsensor (Kistler, Schweiz) misst die Krafteinwirkung auf die Knochenzylinder. Die Antwort des Sensors auf die applizierte Kraft ist eine

elektrische Ladung, deren Höhe linear zur aufgebrachten Kraft ist. Die Höhe der elektrischen Ladung wird gemessen und aufgezeichnet.

Die dynamische Belastung der Knochenproben kann mit verschiedensten Oszillationsmustern durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, die mechanische Belastung in Form von Sinus-, Dreieck- und Rechtecksignalen sowie in Form von komplexen Schwingungsmustern, wie z.B. die Simulation von Laufen und Springen, auf die Knochenzylinder aufzubringen.

2.1.2 Die Kultur- und Belastungskammer

Die verwendete Kultur- und Belastungskammer (KBK) wurde eigens für das ZETOS-System entwickelt, um einerseits Knochenproben über längere Zeit unter kontrollierten Bedingungen kultivieren zu können und andererseits, um die Knochenzylinder mechanisch belasten zu können, ohne diese aus dem Kultursystem entnehmen zu müssen.



Abb. 2.3 Die Kultur- und Belastungskammer mit Zu- und Abflussanschluss

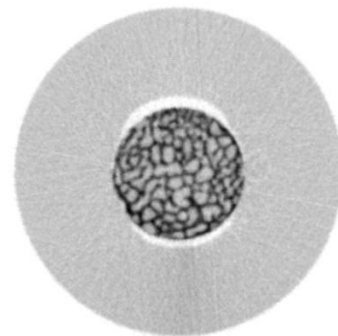


Abb. 2.4 Micro-CT-Aufnahme der KBK

Die KBK besteht aus einem Boden aus Edelmetall (T. Pohl, Universität Marburg), einem Körper aus Polycarbonat (T. Pohl, Universität Marburg), einem Saphir-Kolben (sogenannter Piston) (T. Pohl, Universität Marburg), einem Quad-Ring (Busak & Shamban, S.A.), einem O-Ring Ø 13mm x 1mm, einem O-Ring Ø 19,5mm x 1,78mm, einem O-Ring Ø 100mm x 2mm (alle O-Ringe von C. Otto Gehrken's Gummi und Riemenwerke GmbH & Co. KG) und zwei Luer-Konnektoren männlich (Novodirekt, Deutschland).

Über den Piston übt der PEA die Belastung auf den Knochen aus.

Die KBK verfügt über einen Zu- und einen Abfluss, über den sie an den Mediumkreislauf angeschlossen wird. Die Knochenproben werden auf diese Weise in einer Richtung gleichmäßig vom Kulturmedium durchflossen.

2.1.3 Die Perfusionspumpe

Zur Perfusion der in der KBK befindlichen Knochenprobe wird eine 24-Kanal-Kassettenpumpe (Ismatec) verwendet. Es können gleichzeitig bis zu 24 Kultursysteme mit einer frei wählbaren Durchflussrate perfundiert werden.



Abb. 2.5 Perfusionspumpe mit angeschlossenen Kultursystemen

Im vorliegenden Versuch wurde eine Durchflussrate von 3,2 ml pro Stunde gewählt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Nährstoffversorgung der Knochenproben hiermit gewährleistet ist.

2.1.4 E-Modul

Das E-Modul (Elastizitäts-Modul) oder auch Young's Modulus dient dazu, die Steifigkeit eines Körpers unabhängig von seinen geometrischen Abmessungen zu beschreiben.

Das E-Modul ist folgendermaßen definiert:

$$Y = \delta P / \zeta, \quad \zeta := \frac{\delta x}{x}$$

Y = Youngs modulus (E-Modul); P = Druck; ζ = Strain; x = Höhe

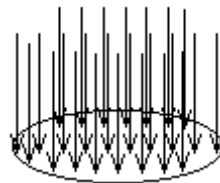
$\delta P := \delta F / A$ stellt die Änderung des Drucks dar, welcher durch die Kompression des Probenkörpers entsteht. ζ wird als “strain” bezeichnet und stellt die relative Änderung der Höhe dar, welche aus der Kompression resultiert.

Diese Gleichung zeigt, dass die Kraft und auch die Fläche unter speziellen Bedingungen gesehen werden müssen. Kraft (F) und Flächenelemente (A) sind normalerweise Vektoren.

Durch die gegebenen Gleichungen ergeben sich sehr genaue Bedingungen für die Messung:

- das Kraftfeld muss homogen sein
- die Oberfläche muss flach und parallel sein
- die Orientierung aller Kraftvektoren muss senkrecht zur Oberfläche sein

Die folgende Figur soll dies veranschaulichen:



Um diese Bedingungen zu erfüllen, ist eine sehr große Sorgfalt bei der Präparation der Knochenproben notwendig (siehe Kapitel 2.3).

Die Proben sollten nicht mehr als $\pm 0,5 \mu\text{m}$ in der Oberfläche und $\pm 3 \mu\text{m}$ in der Parallelität abweichen. Sind die Oberflächen nicht parallel, so wächst die effektive Oberfläche unter Belastung proportional zur aufgebrachten Kraft an. Die Funktion von Kraft zu Kompression wäre also nicht linear.

Sind die Oberflächen zwar parallel, aber rau, dann ist die Kurve erst nach einer kurzen nicht linearen Phase linear. Dadurch wäre die Aussage über die effektive Fläche zu Beginn nicht korrekt und damit die Ergebnisse für Druck und E-Modul falsch.

Nur bei Proben mit glatter Oberfläche und Planparallelität können exakte Werte für Kraft und Kompression erwartet werden.

Dies soll in den folgenden Illustrationen nochmals veranschaulicht werden:

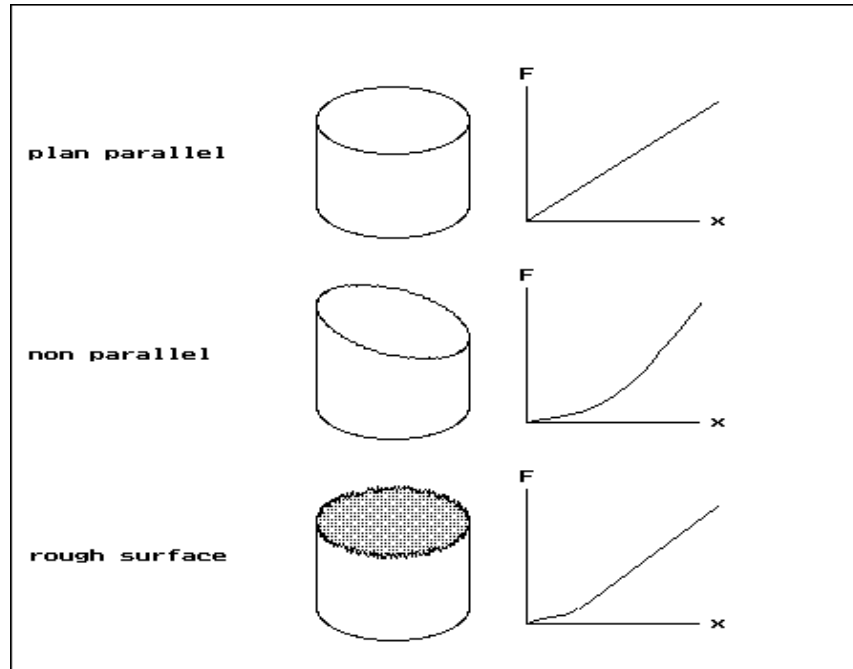


Abb. 2.6 Auswirkung der Probenoberfläche auf das Verhältnis von Kraft und Kompression

Im vorliegenden Versuch wurde die zur vorgegebenen Kompression aufgewendete Kraft zum Zeitpunkt 5 Sekunden und 5 Minuten während der Belastung aufgezeichnet. Dieser Wert wurde zusammen mit der erreichten Kompression zur Errechnung des E-Moduls verwendet.

2.1.5 Krafteinwirkung auf den Hüftkopf

Die Krafteinwirkung auf den menschlichen Hüftkopf sei hier schematisch in Bezug auf seinen Querschnitt dargestellt.

Die folgende Berechnung bezieht sich auf ein Körpergewicht von 70 kg.

Da die Kräfte- und Gewichtsverteilung durch die Trabekelstruktur im menschlichen Hüftkopf sehr komplex ist (Abb. 1.2), sind die hier dargestellten Werte für die wirkenden Kräfte stark vereinfacht und dienen lediglich der Orientierung. Eine bessere Beurteilung der aufgewendeten Kräfte zur Kompression der Knochenproben sollte hiermit möglich sein.

Der in diesem Versuch verwendete Hüftkopf hatte im mittleren Bereich einen Durchmesser von $d = 50 \text{ mm}$.

Hieraus ergibt sich eine Querschnittsfläche von $A = 1963,495 \text{ mm}^2$.

Ein Körpergewicht von $KG = 70 \text{ kg}$ verursacht bei einer einseitigen Belastung der Hüfte eine Gewichtskraft von $F = 686,70 \text{ N}$ ($F = KG \times g$ ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)).

Die Knochenproben haben einen Durchmesser von $d = 10 \text{ mm}$, also $1/5$ des Hüftkopfdurchmessers. Daraus ergibt sich $1/25$ der Querschnittsfläche ($A = \pi \times r^2$).

Die Oberfläche der Knochenproben beträgt $78,54 \text{ mm}^2$.

Geht man vereinfacht davon aus, dass die einwirkende Gewichtskraft gleichmäßig auf die Knochenoberfläche des Hüftkopfs verteilt ist, so muss auf die Oberfläche der einzelnen Knochenprobe $1/25$ der Gewichtskraft einwirken.

Hieraus ergibt sich eine Belastung der Oberfläche der Knochenproben mit $27,468 \text{ N}$ durch das Körpergewicht.

Bei voller Belastung, z.B. durch Springen, verzehnfacht sich die Belastung auf den Hüftkopf (49).

Es ergibt sich eine Krafteinwirkung von $274,68 \text{ N}$ auf die Knochenproben.

Im vorliegenden Versuch wurde von einer physiologischen Krafteinwirkung im Bereich von $25 \text{ N} - 280 \text{ N}$ ausgegangen.

2.2 Das Kulturmedium

Die Knochenproben wurden über 50 Tage mit DMEM HEPES + 10% FCS kultiviert. DMEM HEPES + 10% FCS besteht aus den folgenden Bestandteilen:

13,38 g Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco)
2,383 g HEPES (Sigma)
1,08 g β -Glycerophosphat (Sigma)
0,12 g Natriumhydrogenkarbonat (Merck)
5,866 mg L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH)
10 mg Vitamin C (Wako)
25000 IE Penicillin + 25000 IE Streptomycin (PAA Laboratories GmbH)
100 ml fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom)

Zur Herstellung von DMEM HEPES + 10% FCS wurden die angegebenen Anteile DMEM, HEPES, β -Glycerophosphat, Natriumhydrogenkarbonat, L-Glutamin, Vitamin C und Penicillin/Streptomycin in Aqua bidest. gelöst und dann auf 900 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt.

Anschließend wurde das Kulturmedium auf einen pH Wert von 7,25 eingestellt.

Die so entstandene Lösung wurde steril durch einen 0,22 μ m Bottle Top Filter (Falcon) filtriert. Das FCS wurde zum Schluss ebenfalls steril durch einen Spritzenfilter (Syringe Driven Filter) (Millipore) hinzugegeben.

Für den vorliegenden Versuch wurde das auf diese Weise hergestellte Kulturmedium unter sterilen Bedingungen zu je 6 ml in Rundbogengläser (Kobe) abgefüllt, welche dann an das Kultur- und Belastungssystem angeschlossen wurden.

Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Der pH-Wert des verwendeten Kulturmediums der einzelnen Knochenproben wurde nach jedem Mediumwechsel bestimmt.

DMEM wird häufig für Zellkulturen von Knochen verwendet (20,39,104,144). Die hier verwendete Zusammensetzung wurde in mehreren Vorversuchen an überwiegend bovinen Knochen speziell für dieses System entwickelt.

2.3 Präparation der Knochenproben

2.3.1 Entnahme der Knochenproben

In diesem Experiment wurde der Femurkopf eines 68 jährigen, männlichen Patienten mit Coxarthrose, der sich einer Hüftgelenkersatzoperation unterziehen musste, zur Gewinnung der Knochenproben verwendet.

Bei fortgeschrittener Hüftgelenkarthrose kann als Therapie eine Hüftgelenktotalendoprothese (Hüft-TEP) eingesetzt werden. Bei diesem operativen Verfahren wird der Femur oberhalb der Trochanter durchtrennt und der Femurkopf wird vollständig entfernt.

Nach der Entnahme des Femurkopfs durch den Operateur wurde der Knochen unter sterilen Bedingungen in ein Gefäß mit isotonischer Lösung (Natriumchlorid-Lösung 0,9%) eingelegt und in das Labor gebracht.

Alle sich anschließenden Prozeduren erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Unter einer Sterilwerkbank (BSB4, Gelaire) wurde der Femurkopf in einer speziell hierfür entwickelten Halterung (T. Pohl, Universität Marburg) eingespannt.

Mit Hilfe der Halterung kann der Femurkopf auf dem Vorschubtisch einer Diamantbandsäge (Exakt Apparatebau GmbH) beliebig zu dem Diamantsägeblatt ausgerichtet werden.



Abb. 2.7 Diamantbandsäge und Vorschubtisch



Abb. 2.8 Diamantbandsäge und spezielle Halterung für Knochen (Beispielbild mit proximaler Rindertibia)

Der Femurkopf wurde in 5 mm dicke Scheiben mit einer Planparallelität von $\pm 2 \mu\text{m}$ gesägt.

Während des Sägens wurde der Knochen permanent mit auf 4°C gekühlter, steriler isotonischer Kochsalzlösung gespült. Dies war notwendig, um die Knochenzellen vor Irritationen durch die entstehende Wärme, Sägestaub und Austrocknung zu schützen. Die auf diese Weise gewonnenen Knochenscheiben wurden einzeln bis zu ihrer weiteren Verarbeitung in Petrischalen aufbewahrt, welche mit Phosphat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gefüllt waren.

Zum Herstellen von PBS Lösung werden 9,55 g PBS Dulbecco (Biochrom KG) in einem Liter Aqua bidest. gelöst und für 20 Minuten autoklaviert.

Als nächstes wurden die Knochenzylinder aus den Knochenscheiben ausgebohrt. Zu diesem Zweck wurden die Knochenscheiben in einer speziellen Haltevorrichtung (T. Pohl, Universität Marburg) fixiert. Diese Halterung wurde auf dem XY-Tisch einer Feinfräse (Proxxon GmbH) angebracht.

Aus den fixierten Knochenscheiben wurden mit einem diamantbesetzten Innenlochbohrer (T. Pohl, Universität Marburg) Knochenzylinder mit einem Durchmesser von 10 mm ausgebohrt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nur die makroskopisch unauffälligen, spongiösen Anteile Verwendung fanden.

Während des Bohrvorgangs wurde der Knochen wiederum mit gekühlter, steriler, isotonischer Kochsalzlösung gespült.

Nach jedem Bohrvorgang wurde der Bohrer aus dem Bohrfutter gelöst und die ausgebohrten Knochenzylinder wurden mit einem hierfür entwickelten Probenextraktor (T. Pohl, Universität Marburg) aus dem Innenlochbohrer entnommen.



Abb. 2.9 Bohrer und XY-Tisch

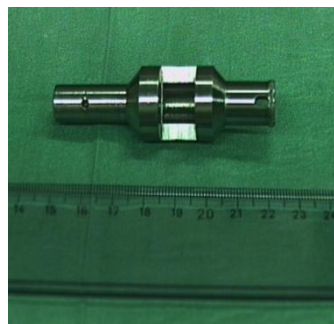


Abb. 2.10 Innenlochbohrer



Abb. 2.11 Innenlochbohrer in Entnahmevorrichtung

Die Knochenzylinder wurden nun bis zur weiteren Verarbeitung in einem mit PBS gefüllten Becherglas aufbewahrt.

Auf diese Weise konnten homogene, spongiöse Knochenproben mit einer Höhe von 5 mm, einem Durchmesser von 10 mm und einer Planparallelität von $\pm 2 \mu\text{m}$ hergestellt werden. Die Anzahl der Knochenzylinder, die auf diese Weise aus einem Femurkopf gewonnen werden können, hängt von der Größe und Beschaffenheit des Knochens ab und variiert daher beträchtlich.

In diesem Versuch konnten 20 humane Knochenproben präpariert werden.

2.3.2 Vorbereitung der Knochenproben

Im Anschluss an die Präparation mussten die Knochenzylinder gewaschen werden, bevor sie in die KBK eingesetzt werden konnten. Die Waschprozedur diente dazu, den noch vorhandenen Bohrstaub und potentielle Infektionserreger auszuwaschen bzw. unschädlich zu machen.

Die Knochenzylinder wurden in ein 100 ml Becherglas (Kobe) eingebracht, welches vollständig mit Earles Medium gefüllt war.

Für das Earles Waschmedium wurden 100 ml Earles Salt Solution 10x (Biochrom KG) und 7,5 ml Natriumhydrogenkarbonat 6%ig (Merck) mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Das Becherglas wurde ohne Luftabschluss verschlossen und in einem Rotator (Reax2, Heidolph), welcher sich mit 25 Umdrehungen pro Minute drehte, eingespannt. Die Knochenproben wurden auf diese Weise für 10 Minuten gespült. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das Earles Medium wurde jedes Mal verworfen und das Becherglas mit den Knochenzylindern erneut aufgefüllt. Im Anschluss daran wurden die Knochenproben nochmals für 20 Minuten mit Earles Medium plus Antibiotika gespült.

Dem oben beschriebenen Earles Medium wurden hierbei noch 25000 IE Penicillin, 25000 IE Streptomycin (PAA Laboratories) und 2 mg Amphotericin B (Sigma) zugefügt.

Nach diesem letzten Spülvorgang konnten die Knochenzylinder in die KBK eingesetzt werden.

2.3.3 Einsatz der Knochenzylinder in die Kultur- und Belastungskammer

Um die Knochenzylinder in die KBK einsetzen zu können, wurden diese wie folgt vorbereitet:

Zuerst wurden die Dichtungsringe in den Körper der KBK eingesetzt. Dann wurde ein Hohlzylinder an das Bodenteil des Körpers der KBK angeschraubt. In den Hohlzylinder wurde der Knochenzylinder eingesetzt. Mittels eines Pushers wurde der Knochenzylinder in der KBK platziert. Sowohl Hohlzylinder als auch der Pusher wurden als Einsetzhilfe für die KBK entwickelt (T. Pohl, Universität Marburg).



Abb. 2.12 – 2.14 Einsatz einer Knochenprobe in die KBK mittels Hohlzylinder und Pusher

Nachdem der Knochenzylinder in der KBK platziert war, wurde der Piston eingesetzt. Zuletzt wurde der Boden der KBK mit dem Körper handfest verschraubt.

2.3.4 Anschluss der Kultur- und Belastungskammer an den Mediumkreislauf

Die folgenden Gegenstände wurden zum Zusammenstellen des geschlossenen Mediumkreislaufs benötigt:

Kultur- und Belastungskammer (T. Pohl, Universität Marburg)

Rundbodenglas (Kobe)

Reservoirstopfen (T. Pohl, Universität Marburg)

Tygon-Schlauch 7 cm (1x) (Norton)

Tygon-Schlauch 25 cm (2x) (Norton)

Tygon-Schlauch 90 cm (1x) (Norton)

Pumpenschlauch-PVC (Gilson)

Luer-Konnektor männlich (4x) (Novodirekt)

Schlauchverbinder aus Edelmetall (T. Pohl, Universität Marburg)

Das Zusammensetzen der zuvor sterilisierten Gegenstände wurde unter einer sterilen Werkbank vorgenommen.

Das mit 6 ml Kulturmedium gefüllte Rundbodenglas wurde mit dem Reservoirstopfen verschlossen.

Die Ein- und Ausgänge des Reservoirstopfens und der KBK wurden mit den Luer-Konnektoren, die zum Anschluss der Schläuche benötigt wurden, versehen.

Der 90 cm Tygon-Schlauch wurde mit dem Mediumausgang der KBK und dem Mediumeingang des Reservoirstopfens verbunden.

Der Pumpenschlauch wurde über die Edelmetallverbinder in beide Richtungen mit den 25 cm Tygon-Schläuchen verbunden.

Dieses Schlauchsystem wurde an den Mediumausgang des Reservoirstopfens und den Mediumeingang der KBK angeschlossen.

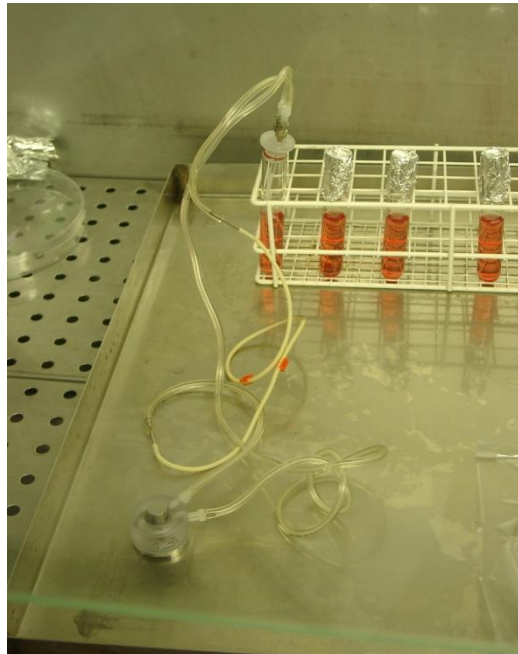


Abb. 2.15 Geschlossenes Kulturmediumsystem

Das geschlossene System wurde dann in den zuvor mit Flächendesinfektion gereinigten Versuchsraum gebracht. Der Pumpenschlauch wurde in die hier bereitstehende Perfusionspumpe eingelegt. Das geschlossene System konnte nun mit der gewählten Perfusionsgeschwindigkeit von 3,2 ml pro Stunde perfundiert werden.

Der Raum blieb während des gesamten Versuchs auf 37°C aufgewärmt.

Um eine möglichst geringe Infektionsgefahr zu gewährleisten, durfte der Versuchsraum während der gesamten Zeit nur mit Handschuhen (Ansell Medical) und Mundschutz (Surgine Plus, Ethicon) betreten werden.

Im Versuchsraum selbst befand sich noch die Belastungseinheit des ZETOS-Systems. Die elektronische Steuer- und Messeinheit und der PC befanden sich im Nachbarraum.

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Einteilung der Knochenproben in verschiedene Versuchsgruppen

Bei der Präparation des Femurkopfs wurden $n = 20$ Knochenzylinder gewonnen. Diese wurden randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt. Die Randomisierung war durch die Spülvorgänge gewährleistet, da die Knochenzylinder in dem Becherglas gemischt und danach in willkürlicher Reihenfolge in die Kultur- und Belastungskammern eingesetzt wurden.

Gruppe 1 (Kontrolle) bestand aus 6 Knochenzylindern und wurde während des gesamten Versuchs nicht belastet. Sie diente als Kontrollgruppe.

Gruppe 2 (2000 μ strain) bestand aus 7 Knochenzylindern und wurde ab dem zweiten Versuchstag täglich mit einer Kompression von 10 μ m dynamisch über 5 Minuten belastet.

Gruppe 3 (4000 μ strain) bestand aus 7 Knochenzylindern und wurde ab dem zweiten Versuchstag täglich mit einer Kompression von 20 μ m dynamisch über 5 Minuten belastet.

2.4.2 Versuchsablauf

Die beiden Belastungsgruppen (2000 μ strain, 4000 μ strain) wurden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit ab dem zweiten Versuchstag täglich mit einer Frequenz von 1 Hz über 300 Zyklen dynamisch belastet.

Als Belastungssignal wurde ein Rechteckreiz gewählt.

Alle Proben der Belastungsgruppen wurden vor dem Belastungsvorgang mit einer Vorlast von 25 Newton versehen.

Die Höhe der aufgewendeten Kraft des PEA wurde bei 15 Sekunden und 5 Minuten der Belastung gemessen und aufgezeichnet.

Am 1. und 2. Versuchstag wurden die Knochenzylinder nicht belastet, um nach der Irritation durch die Präparationsprozedur eine gewisse Regeneration der Knochenzellen zu erreichen.

Das Kulturmedium wurde am 1., 2. und 3. Versuchstag gewechselt, um genügend Nährstoffe zur Regeneration der Knochenzellen bereit zu stellen.

Danach wurde das Kulturmedium jeden 2. Tag gewechselt. Der Wechsel wurde jeweils direkt vor der Belastung durchgeführt. Der pH-Wert des gebrauchten Kulturmediums wurde mit einem pH-Meter (Inolab) bestimmt.

Für den Kulturmediumwechsel wurde zunächst die Kassettenpumpe kurzfristig angehalten, damit keine Luft in das System gelangen konnte. Dann wurde der Reservoirstopfen von dem jeweiligen Rundbodenglas entfernt und sofort auf ein neues, mit 6 ml frischem Kulturmedium gefüllten Rundbodenglas aufgesetzt.

Nachdem der Kreislauf mit neuem Kulturmedium versehen und fest verschlossen war, wurde die Kassettenpumpe wieder gestartet.

Während des gesamten Versuchs wurden die Knochenzylinder mit 3,2 ml / Stunde perfundiert.

Am 16., 35. und 45. Versuchstag wurde eine polychrome Sequenzmarkierung durchgeführt. Hierfür wurde am 16. und 35. Versuchstag Calcein (Sigma) und am 45. Versuchstag Alizarin Complexone (ICN Biomedicals Inc.) verwendet (siehe Kapitel 2.4.3).

Am 25. und 38. Versuchstag wurden Proben des Kulturmediums zur Bestimmung von PgE2, IL-6, TNF- α und Osteoprotegerin entnommen (siehe Kapitel 2.4.4).

2.4.3 Durchführung der polychromen Sequenzmarkierung

2.4.3.1 Calcein

Die polychrome Sequenzmarkierung erfolgte am 16. und 35. Versuchstag mit Calcein.

Das Fluochrom wurde dem Kulturmedium ohne FCS zugesetzt und für 4 Stunden am 16. Versuchstag, beziehungsweise für 2 Stunden am 35. Versuchstag an das Kreislaufsystem angeschlossen.

Anschließend wurden die Knochenzylinder zweimal für jeweils eine Stunde mit Kulturmedium gespült. Danach wurden die Systeme wieder regulär perfundiert.

Die Calcein-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt:

1. 50 mg Calcein (Sigma) wurden in 100 ml Aqua ad injectabile (Braun) gelöst.
2. 540 μ l der Calcein-Lösung wurden jeweils in 9 ml Kulturmedium ohne FCS Zusatz gelöst.

Eine erforderliche Arbeitskonzentration des Calceins von 30 µg pro ml Kulturmedium wurde auf diese Weise erreicht.

2.4.3.2 Alizarin Complexone

Die polychrome Sequenzmarkierung mit Alizarin Complexone (INC Biomedicals Inc.) erfolgte am 45. Versuchstag. Das Fluochrom wurde für 4 Stunden an das Kreislaufsystem angeschlossen. Hier wurde im Anschluß zweimal für eine Stunde mit Kulturmedium gespült. Die reguläre Perfusion wurde anschließend fortgesetzt. Die Alizarin Complexone-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt:

1. 30 mg Alizarin Complexone wurden in 10 ml Natrium-Chlorid-Lösung 0,9% (Braun) gelöst.
2. Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt.
3. 180 µl Alizarin Complexone-Lösung wurden in 9 ml Kulturmedium ohne FCS Zusatz gelöst.

Eine erforderliche Arbeitskonzentration des Alizarin Complexone von 60 µg pro ml Kulturmedium wurde auf diese Weise erreicht.

2.4.4 Probenentnahme zur Mediatorenbestimmung

Proben des Kulturmediums zur Bestimmung von PgE2 wurden am 25. und 38. Versuchstag entnommen. Am 38. Versuchstag wurden zusätzlich Proben zur Bestimmung von IL-6, TNF-α und Osteoprotegerin entnommen.

Direkt nach der Belastung der einzelnen Knochenzylinder wurde das jeweilige Kulturmedium gewechselt. Das gebrauchte Kulturmedium wurde verworfen.

Die Probenentnahme erfolgte 1, 5, 6, 7, 11 und 12 Stunden nach der Belastung. Zu den gleichen Zeiten wurden auch Proben aus drei Systemen der Kontrollgruppe entnommen. Hierfür wurde das Kulturmedium nach einer Stunde Laufzeit gewechselt. Diese Zeit war notwendig, um eine genügend hohe Konzentration von Mediatoren im Kulturmedium zu erreichen, damit diese mit den verfügbaren Techniken gemessen werden konnten.

Aus dem gebrauchten Kulturmedium wurden je 1,8 ml in 3 Mikroröhren 2 ml mit Verschluss (Sarstedt) pipettiert. Diese wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in einem -80°C Gefrierschrank bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Um die einstündige Laufzeit des Kulturmediums auch nach 5 und 11 Stunden zu gewährleisten, wurde nach 4 und nach 10 Stunden ebenfalls das Medium gewechselt. Dieses Kulturmedium wurde verworfen.

Die Messungen der PgE2 Werte wurden im Labor der Kinderklinik der Philipps-Universität-Marburg durchgeführt.

Die Messungen der IL-6, TNF- α und Osteoprotegerin Werte wurden im Zentrallabor des Klinikums der Philipps-Universität-Marburg durchgeführt.

2.5 Aufarbeitung der Knochenproben

Die Aufarbeitung der Knochenproben erfolgte nach den Vorgaben von Kulzer-Histo-Technik (Wehrheim) zum Gebrauch von Technovit 9100, einem Kunststoff zur Einbettung von mineralisiertem Gewebe zur Herstellung von histologischen Dünnschnitten.

2.5.1 Die Alkoholfixierung

Die Knochenproben wurden am letzten Versuchstag zuerst über 3 Stunden mit 40%igem Äthanol innerhalb der Kultur- und Belastungskammer perfundiert. Hierfür wurden Rundbodengläser (Kobe) mit 9 ml 40%igem Äthanol gefüllt und an den Zufluss des Kultur- und Belastungssystems angeschlossen. Um einen Rückfluss des Kulturmediums und eine Verdünnung des Äthanol zu vermeiden, wurde der Abfluss an ein weiteres Rundbodenglas angeschlossen.

Gleichzeitig wurden die KBK in ein Eiswasserbad eingelegt, um eine Abkühlung der Knochenzylinder und des Äthanol auf 4°C zu erreichen.

Darauffolgend wurden die Knochenzylinder aus den KBK entnommen und einzeln in nummerierte Drahtkörbchen eingelegt. Diese wurden dann in Bechergläsern (Biochrom) mit 70%igem Äthanol für 7 Tage bei 4°C eingelegt. Die Bechergläser wurden auf einem Rütteltisch ständig bewegt, um eine möglichst gute Durchdringung der Präparate zu erreichen.

Das Äthanol wurde täglich gewechselt.

2.5.2 Die Dehydrierung und Entfettung

Nach der Fixierung verblieben die Knochenzylinder weitere 6 Tage bei 4°C in den Bechergläsern. Zur Dehydrierung wurde eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet. Die folgenden Schritte wurden für jeweils 24 Stunden unter ständiger Bewegung der Proben durchgeführt.

1. 80%iges Äthanol
2. 90%iges Äthanol
3. 96%iges Äthanol

4. 96%iges Äthanol
5. absolutes Äthanol
6. absolutes Äthanol

Die Entfettung der Knochenzylinder wurde mit Xylol durchgeführt. Hierfür wurden die Proben für 48 Stunden in Xylol eingelegt, wobei das Xylol alle 12 Stunden gewechselt werden musste.

2.5.3 Die Kunststoffeinfettung

Die Kunststoffeinfettung der Knochenzylinder erfolgte mit Technovit 9100 der Firma Kulzer-Histo-Technik (Wehrheim).

Die Knochenzylinder mussten hierbei zuerst infiltriert und dann eingebettet werden. Die Lösung für beide Arbeitsschritte hatte die gleiche Zusammensetzung:

1. Basislösung 94%
2. Weichmacher 5%
3. Aktivator 1%

Die Basislösung ist ein Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis (Kulzer). Als Weichmacher wurde Dibutylphthalat (Merck) verwendet. Als Aktivator wurde Benzoylperoxid (Kulzer) verwendet.

Die Infiltration wurde im Vakuum bei 4°C durchgeführt. Dadurch sollte einerseits eine bessere Infiltration der Knochenzylinder erreicht und andererseits eine frühzeitige Polymerisation der Lösung verhindert werden.

Die Infiltrationsdauer betrug 7 Tage.

Für den folgenden Polymerisationsvorgang wurden Rollrandschnappdeckelgläser mit Polyschnappdeckel (Scherf Glas) zu zirka zwei Drittel mit Infiltrations- und Einbettlösung gefüllt. Zur Kennung der Knochenproben wurden mit Bleistift beschriftete Filterpapiere in die Lösung eingelassen. In die so vorbereiteten Gläser wurden dann die zugehörigen Knochenzylinder eingelassen.

Der Überschuss an Einbettlösung war notwendig, da mit einer zirka 15%igen Polymerisationsschrumpfung zu rechnen war. Auf diese Weise wurde gleichzeitig ein Kunststoffsockel zur Einspannung in das Mikrotom gegossen.

Die mit den Knochenzylindern versehenen Rollrandschnappdeckelgläser wurden mit den Polyschnappdeckeln verschlossen und aufrecht in eine flache, wassergefüllte Schale gestellt. Dies sollte der Ableitung der Polymerisationswärme dienen.

Die Polymerisationszeit bei Raumtemperatur betrug zirka 48 Stunden.

Zur Entnahme der Kunststoffblöcke wurden die Gläser vorsichtig mit einem Hammer zerschlagen.

2.5.4 Anfertigung der Dünnschnitte

Durch die Einbettung entstanden Kunststoffzylinder, welche die Knochenproben beinhalteten. Zur leichteren Arbeit mit dem Mikrotom (Reichert-Jung) wurde der überschüssige Kunststoff zuerst mit einer Bandsäge abgetragen.

Vor der Anfertigung der Dünnschnitte mussten Objektträger (Menzel-Gläser) mit einer Chromalaun-Gelatine-Lösung beschichtet werden, um eine bessere Haftung der Schnitte auf den Objektgläsern während der Entacrylierung und des Färbens zu erreichen.

Die Chromalaun-Gelatine-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt:

1. 4,5g weiße Blatt-Gelatine wurden in 1 Liter Aqua dest. unter ständigem Rühren und unter Wärmezufuhr aufgelöst.
2. Die Lösung wurde filtriert.
3. Der filtrierten Lösung wurden 38,5 ml einer 4%igen Chromalaunlösung (4g Kaliumbrom(III)Sulfat auf 100 ml Aqua dest.) hinzugesetzt.
4. 8 - 10 Tropfen eines Emulgators wurden beigemischt.

Die Beschichtung der Objektträger:

1. Anätzung der Objektträger in 2%iger Salzsäure über 5-10 Minuten.
2. Spülung in Aqua dest.
3. Einstellen der Objektträger in 3%ige Natronlauge über 5 Minuten.
4. Spülung in Aqua dest.
5. Einstellen der Objektträger in die Chromalaun-Gelatine-Lösung über 2-3 Minuten.

6. Trocknen der Objektträger

Zusätzlich zu den auf diese Weise vorbereiteten Objektträgern wurden noch wässrige Alkohollösung zum Schneiden der Dünnschnitte, 96%ige Alkohollösung zur Dehnung der Dünnschnitte, ein feiner Pinsel zum Auftragen des Alkohols, eine feine Pinzette zum Abheben der Schnitte und Polyethylenfolie (Kulzer) zur Abdeckung der Präparate benötigt.

Zum Herstellen der Dünnschnitte wurde ein Hartschnittmikrotom–Polycut-E (Reichert-Jung) verwendet. Die Schnittgeschwindigkeit und die Schnittdicke sind bei diesem Gerät frei wählbar.

Der Kunststoffsockel der Proben wurde auf dem Vorschubtisch des Mikrotoms fixiert. Zuerst wurden die Knochenzylinder mit einer Schichtdicke von 15 µm und schneller Vorschubgeschwindigkeit geschnitten. Hierbei wurde der Knochenzylinder schräg durchgeschnitten, sodass rechteckige Querschnitte entstanden.

Es wurde zirka ein Drittel des Präparats auf diese Weise abgeschnitten, um genügend große Schnitte zur histologischen Auswertung zu erhalten. Nachdem aus diesem Bereich mehrere Dünnschnitte hergestellt worden waren, wurde die Knochenprobe wiederum bis zur Mitte vorgeschnitten, um auch aus dem Zentrum Dünnschnitte zu erhalten.

Die Dünnschnitte wurden mit einer Geschwindigkeit von 3 Schnitten pro Minute und einer Schichtdicke von 4 µm für die Mason-Goldner-Färbung und einer Schichtdicke von 5 µm für die Fluoreszenzfärbung hergestellt.

Während des Schneidevorgangs wurde 70%ige Alkohollösung in reichlicher Menge mit einem feinen Pinsel auf die entstehenden Dünnschnitte aufgetragen. Dies bewirkte ein Abschwimmen der Präparate vom Messer und verhinderte das Einrollen der dünnen Schnitte.

Die Dünnschnitte wurden dann mit einer feinen Pinzette vom Messer abgehoben und auf einen mit 96%igem Äthanol benetzten Objektträger aufgelegt. Die Schnitte selbst wurden nochmals mit 96%igem Äthanol benetzt, was zu einer Streckung der Präparate führte.

Auf die vorher mit der Knochenbezeichnung beschrifteten Objektträger wurden jeweils 4 Dünnschnitte aufgetragen.

Nachdem diese mit 96%igem Äthanol angefeuchtet und gestreckt waren, wurde eine dünne Polyethylenfolie (0,025 mm) (Kulzer), in der selben Größe wie der

Objektträger, aufgelegt. Der zwischen den Dünnschnitten verbliebene Alkohol wurde mit Hilfe zweier Zellstofftupfer ausgestrichen.

Die so hergestellten Präparate, welche durch Löschpapierstreifen getrennt waren, wurden gestapelt und für 48 Stunden in einer speziellen Halterung (T. Pohl, Universität Marburg) handfest gepresst in einem Brutschrank bei 50°C aufbewahrt. Nach der Trocknung konnten Löschpapier und Polyethylenfolie entfernt werden. Die Präparate konnten nun entacryliert und gefärbt werden.

Von jeder Knochenprobe wurden auf diese Weise jeweils 8 Dünnschnitte aus dem vorderen Drittel und der Mitte für die Mason-Goldner-Färbung und für die Fluoreszenz-Färbung hergestellt. Dies macht 32 Dünnschnitte pro Knochenzylinder. Da von jeder Knochenprobe noch zirka die Hälfte eingebettet in dem Kunststoffblock verblieben ist, können jederzeit weitere Dünnschnitte für Untersuchungen hergestellt werden.

Die Knochenproben können auf diese Weise über viele Jahre erhalten und weiteren Untersuchungen zugeführt werden.

2.5.5 Die Entacrylierung

Vor der histologischen Färbung der Präparate musste das Einbettungsmedium herausgelöst und entfernt werden. Diesen Vorgang nennt man Entacrylierung. Nach der Entacrylierung mussten die Präparate gefärbt und versiegelt werden. Die Schnitte, welche für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung vorgesehen waren, mussten nur versiegelt werden.

Die Entacrylierung wurde mit 2-Methoxyethylacetat (2-MEA) (Merck), einer absteigenden Alkoholreihe und Aqua dest. folgendermaßen durchgeführt:

Bei allen Schritten wurden die Objektträger gemeinsam in einer Halterung in Küvetten eingestellt.

- | | | |
|-------------|------------------|------------|
| 1. Küvette: | 2-MEA | 20 Minuten |
| 2. Küvette: | 2-MEA | 20 Minuten |
| 3. Küvette: | 2-MEA | 20 Minuten |
| 4. Küvette: | 100%iges Äthanol | 3 Minuten |
| 5. Küvette: | 96%iges Äthanol | 3 Minuten |

- | | | |
|--------------|-----------------|-----------|
| 6. Küvette: | 80%iges Äthanol | 3 Minuten |
| 7. Küvette: | 70%iges Äthanol | 3 Minuten |
| 8. Küvette: | 50%iges Äthanol | 3 Minuten |
| 9. Küvette: | Aqua dest. | 3 Minuten |
| 10. Küvette: | Aqua dest. | 3 Minuten |

Die absteigende Alkoholreihe sowie die Spülung mit Aqua dest. dienen der Rehydrierung der Präparate. Anschließend konnten die Präparate gefärbt und versiegelt werden.

2.6 Histologie

2.6.1 Die Mason-Goldner-Färbung

Die Mason-Goldner-Färbung ist eine Trichromfärbung und wird als Standardfärbung für die Knochendomorphometrie verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde sie angewandt, da hier eindeutig mineralisierte und nicht mineralisierte Knochenmatrix farblich voneinander abgegrenzt werden kann.

In den Präparaten stellt sich mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen leuchtend grün, verkalkte Knorpelmatrix hellgrün, Osteoid (nicht mineralisierte Knochenmatrix) rot, Zellkerne blau-schwarz und das Zytoplasma rötlich-braun dar.

Die Bewertung der Osteoidbildung ist so qualitativ und quantitativ möglich. Weiterhin kann der Anteil an aktiver Knochenoberfläche beurteilt werden. Dies ist der Anteil an Knochenoberfläche, auf dem aktiv Osteoid gebildet wird.

Da in den meisten Arbeiten Paraffin zur Einbettung der Knochenproben verwandt wurde, sind die in der Literatur verwendeten Färbemethoden danach ausgerichtet. Die hier verwendete Färbemethodik wurde in mehreren Vorversuchen entwickelt und optimiert, um gute Ergebnisse bei der hier verwendeten Einbettungstechnik zu gewährleisten.

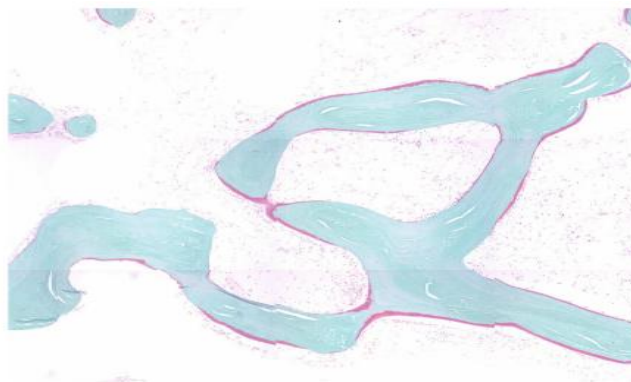


Abb. 2.16 Beispiel eines nach Mason-Goldner gefärbten Präparatausschnitts (40-fache Vergrößerung)

2.6.1.1 Herstellung der Färbelösung

Zuerst wurde „Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung“ hergestellt.

Als Stammlösung A diente Hämatoxylin-Lösung.

Hierfür wurde 1 g Hämatoxylin in 100 ml 96%igem Äthanol gelöst und musste vor der Anwendung eine Woche lang reifen.

Die Stammlösung B war Eisenchloridlösung.

Hierfür wurde 1,5 g Eisen(III)chlorid wasserfrei in 100 ml Aqua dest. gelöst und 1 ml konzentrierte Salzsäure zugesetzt.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden die beiden Stammlösungen im Verhältnis 1:1 gemischt.

Als nächstes wurde „Säurefuchsin-Ponceau-Lösung“ hergestellt.

0,2 g Ponceau de Xylidine und 0,1 g Säurefuchsin wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst und 0,6 ml Eisessig zugesetzt.

Zur Herstellung von „Phosphormolybdänsäure-Orange G-Lösung“ wurden 4 g Phosphormolybdänsäure in 100 ml Aqua dest. gelöst und 2 g Orange G beigelegt.

Die „Lichtgrün-Lösung“ wurde durch das Lösen von 0,2 g Lichtgrün in 100 ml Aqua dest. mit Zusatz von 0,2 ml Eisessig hergestellt.

2.6.1.2 Färbevorschrift

1. Entacrylierung in 2-MEA dreimal für jeweils 20 Minuten
2. Einstellen in eine absteigende Alkoholreihe
3. Spülen in Aqua dest. zweimal für jeweils 3 Minuten
4. Einstellen in Weigerts-Eisenhämatoxylin-Lösung für 10 Minuten
5. Bläuen mit Leitungswasser für 10 Minuten
6. Färben in Säurefuchsin-Ponceau-Lösung für 7 Minuten
7. Abspülen mit 1%iger Essigsäure
8. Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange G-Lösung für 7 Minuten
9. Abspülen mit 1%iger Essigsäure
10. Gegenfärbung mit Lichtgrün-Lösung für 15 Minuten
11. Auswaschen mit 1 %iger Essigsäure
12. Einstellen in aufsteigende Alkoholreihe
13. Dehydratisieren in Xylol zweimal für jeweils 5 Minuten
14. Eindecken mit Entellan

2.6.1.3 Eindeckung der Präparate

Zum Eindecken der Präparate wurden diese mit dem Schnelleindeckmittel Entellan (Merck) bestrichen und dann mit einem Deckglas (24 x 60 mm) (Superior Marienfeld) abgedeckt. Nach kurzer Trocknungszeit konnten die Präparate dann mikroskopiert werden.

2.6.2 Die Fluoreszenz-Färbung

Die polychrome Fluoreszenzmarkierung mit den Fluorochromen Calcein (Sigma) und Alizarin Complexone (ICN Biomedicals Inc.) wurde dynamisch im Laufe des Versuchs an den Tagen 16, 35 und 45 durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.3).

Zur Auswertung der Präparate mussten diese nicht mehr weiter gefärbt werden.

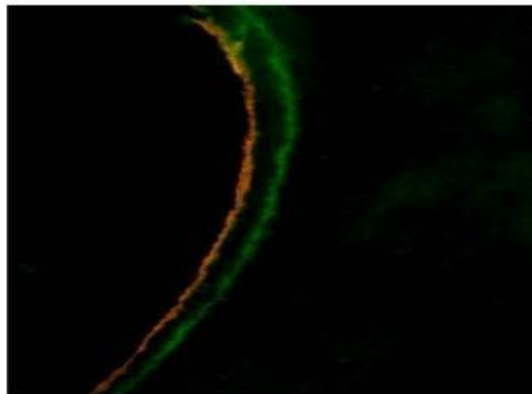


Abb. 2.17 Doppelbande bei polychromer Sequenzmarkierung mit Calcein (grün) und Alizarin (rot)

2.6.2.1 Eindeckung der Präparate

Nach der Entacrylierung der Präparate (siehe Kapitel 2.5.5) wurden diese einmal für 20 Minuten in Xylol eingestellt, dann dreimal für jeweils 20 Minuten in 2-MEA. Die Präparate wurden danach zweimal kurz mit Xylol abgespült, bevor sie eingedeckt werden konnten. Zur Eindeckung wurde das Schnelleindeckmittel Entellan (Merck) verwendet. Die Präparate wurden mit einem Deckglas (Superior Marienfeld) abgedeckt.

2.6.3 Histologische Auswertungsverfahren

Die eingedeckten Dünnschnitte wurden in der Klinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle an einem speziellen Auswertungssystem für Knochenhistologie bearbeitet.

Die für diesen Versuch benötigten Spezifikationen des Systems wurden von Dr. Jörg Brandt (Universität Halle) erstellt.

Zur Bearbeitung der Präparate wurde ein Axioplan Mikroskop (Zeiss) mit angeschlossener Farbvideokamera 3ccd (Sony) verwendet.

Die zu bearbeitenden Präparate wurden auf einem XY-Tisch fixiert.

Die Aufzeichnung der mikroskopischen Bilder sowie die hierfür benötigte Steuerung des XY-Tisches wurden per PC durch das Programm KS 300 Vers. 3.0 (Zeiss Vision GmbH) gesteuert.

2.6.3.1 Auswertung der Mason-Goldner-Färbung

Bei der Auswertung der Mason-Goldner-Färbung war hauptsächlich das gebildete Osteoid von Interesse. Untersucht wurde die Menge an neugebildetem Osteoid, zum Einen im Verhältnis zur Gesamtfläche des eingescannten Bereichs, zum Anderen im Verhältnis zum mineralisierten Knochen. Weiterhin wurde die aktive Knochenoberfläche betrachtet, das heißt, die Knochenoberfläche, welche mit Osteoid bedeckt ist.

Jeder Dünnschnitt wurde einzeln in 40 Einzelbildern mit einer 40fachen Vergrößerung eingescannt. Am Computer wurden die Einzelbilder wieder zu einem Bild vereinigt.

Dieses histologische Bild musste dann mit einer Bildbearbeitungssoftware nachbearbeitet werden. Hierbei wurde das Programm Adobe Photo Shop 5.0 (Adobe) verwendet. Die Nachbearbeitung diente dazu, eventuelle Färbeartefakte in den Bildern zu erkennen und diese vor der Auswertung auszublenden.

Als Färbeartefakte wurden alle rot angefärbten Bereiche gewertet, welche nicht eindeutig als Osteoid zu identifizieren waren. Dies waren zum Einen Farbrückstände, welche nicht vollständig ausgewaschen worden waren, zum Anderen waren dies die angefärbten Kollagenanteile von angeschnittenen Blutgefäßen.

Diese Färbeartefakte mussten ausgeblendet werden, da das Auswertungsprogramm KS 300 Vers. 3.0 (Zeiss) darauf programmiert war, rote und grüne Farbbereiche zu erkennen und gegeneinander auszuwerten. Daher war es besonders wichtig, dass nur Osteoid als rot erkannt wurde und nur mineralisierter Knochen als grün.

Zur Überprüfung, welche Bereiche das Programm zur Auswertung erkannt hatte, wurde ein Negativbild erstellt. Dieses wurde am Monitor im direkten Vergleich zum eingescannten Bild angezeigt. Hierbei zeigte das Programm im Negativbild alle vorher grünen Anteile in blau an und alle vorher roten Anteile in gelb. Konnten so die erkannten Knochenanteile als korrekt bestätigt werden, wurde nun die eigentliche Messung durchgeführt.

Gemessen wurden die prozentualen Anteile von Knochen und Osteoid im Verhältnis zur Gesamtfläche des Präparats und im Verhältnis zueinander. Hierfür wurden alle als gefärbt erkannten Pixel vom Programm addiert und in das Verhältnis zur Gesamtpixelzahl des gescannten Bildes gebracht.

Ebenfalls wurde erfasst, welcher Anteil der Knochenoberfläche eine Osteoidauflagerung aufweist. Dies wurde als aktive Knochenoberfläche angesehen und prozentual im Verhältnis zur Gesamtoberfläche der Knochen trabekel errechnet. Hierfür wurden an 200 Stellen des Präparats Querschnitte angelegt, auf deren Weg der geschnittene Knochen und die Osteoidauflagerungen vermessen wurden. Am Computer wurden die Werte dann prozentual verrechnet.

2.6.3.2 Auswertung der Fluoreszenz-Färbung

Die Auswertung der Fluoreszenz-Färbung erfolgte analog zu der Auswertung der Mason-Goldner-Färbung. Hier waren die Macros so programmiert, dass orange (Alizarin Complexone) und grüne (Calcein) Anteile der Präparate prozentual im Verhältnis zur Gesamtfläche und im Verhältnis zum verkalkten Knochen berechnet wurden. Auch hier wurden die einzelnen Arbeitsschritte kontrolliert und Färbeartefakte wurden vor der Auswertung ausgeblendet.

Zur Berechnung der Wachstumsrate, der Mineral Apposition Rate (MAR), wurden an 50 Stellen des Präparats Querschnitte angelegt, auf deren Weg angeschnittene Doppelbanden von Alizarin Complexone und Calcein vermessen wurden. Als 1. Label wurde die Calcein Färbung vom 16. Tag festgelegt, da die 2. Calcein Färbung am 35. Tag für nur 2 Stunden durchgeführt wurde und vermutlich nicht in den

Knochen eingelagert wurde. Das 2. Label war die Alizarin Färbung vom 45. Tag. Gemessen wurde an 50 Stellen des Präparats, an denen ein Doppellabel einwandfrei sichtbar war. Insgesamt wurden von jeder Knochenprobe 4 Schnitte auf diese Weise vermessen. Die Messung erfolgte mit Adobe Photo Shop 5.0 (Adobe), die statistische Auswertung mit SPSS 10.0.

Die durchschnittliche Wachstumsbreite pro Knochenprobe wurde durch die Anzahl der zwischen den Färbungen liegenden Versuchstage geteilt. Dies waren 29 Tage. Auf diese Weise konnte eine Wachstumsrate – Mineral Apposition Rate (MAR) – in $\mu\text{m}/\text{Tag}$ errechnet werden.

2.7 Statistik

Die Aufbereitung der erfassten Daten sowie deren Auswertung und graphische Darstellung erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS 10.0 lizenziert für die Orthopädische Klinik der Philipps-Universität Marburg.

2.7.1 Auswertung der Daten

Die Untersuchung der gemessenen Werte auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen erfolgte durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und mit dem Kruskal-Wallis-H-Test.

2.7.1.1 Kruskal-Wallis-H-Test

Mit dem Kruskal-Wallis-H-Test kann geprüft werden, ob mehrere unabhängige Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Der Kruskal-Wallis-H-Test, eine Erweiterung des Mann-Whitney-U-Tests, ist die nichtparametrische Entsprechung der einfaktoriellen Varianzanalyse und erkennt Unterschiede in der Lage der Verteilung.

Dieses Testverfahren wird bei nicht normal verteilten Stichproben angewendet.

Ein Wert von $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an.

2.7.1.2 Einfaktorielle ANOVA – Post-Hoc-Test nach Bonferroni

Der Post-Hoc-Test nach Bonferroni wird bei normal verteilten Stichproben angewendet.

Es werden paarweise Vergleiche zwischen den Gruppenmittelwerten mittels T-Tests durchgeführt. Dabei wird auch die Gesamtfehlerrate geregelt, indem die Fehlerrate für jeden Test auf den Quotienten aus der experimentellen Fehlerrate und der Gesamtzahl der Tests gesetzt wird. Dadurch wird das Signifikanzniveau an Mehrfachvergleiche angepasst.

Ein Wert von $p < 0,05$ zeigt einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte an.

2.7.1.3 T-Test

Der T-Test wird angewandt, um zwei Stichproben vom Umfang n_1 und n_2 , mit dem Mittelwert \bar{x}_1 und \bar{x}_2 und Standardabweichung s_1 und s_2 miteinander zu vergleichen.

Die Prüfgröße ist:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{1,2} \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{mit} \quad s_{1,2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times s_1^2 + (n_2 - 1) \times s_2^2}{n_1 - 1 + n_2 - 1}}$$

Die Prüfgröße t ist als Quotient aus der Differenz der Mittelwerte ($\bar{x}_1 - \bar{x}_2$) und dem mittleren Fehler dieser Differenz zu verstehen.

Für die Auswertung spielt die Anzahl der Freiheitsgrade eine Rolle:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Das Signifikanzniveau kann anhand von Tabellen abgelesen werden.

2.7.2 Graphische Darstellung der Ergebnisse

2.7.2.1 Fehlerbalken

Durch Fehlerbalken werden die Mittelwerte (Quadrat, Kreis und Dreieck) und die einfache Standardabweichung (Strich über und unterhalb des Mittelwerts) der Gruppen dargestellt.

2.7.2.2 Boxplot

Bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse anhand von Boxplots werden der Median (schwarze Linie in der Mitte), die 25% und 75% Perzentile (Box ober- und unterhalb des Medians), das Minimum und Maximum (Linie über und unter der Box) und Ausreißer (als Stern oder Kreis) dargestellt.

Die Darstellung der Werte anhand eines Boxplots verdeutlicht die Verteilung genauer. Diese Darstellung ist hier bei allen nicht normal verteilten Ergebnissen zusätzlich gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchsverlauf

3.1.1 Versuchsdurchführung

Die humanen Knochenproben wurden über 50 Tage in Kultur gehalten.

Sie wurden ab dem zweiten Tag entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit täglich belastet.

Das Kulturmedium wurde die ersten drei Tage täglich und dann an jedem zweiten Tag gewechselt.

Zu Beginn des Versuchs bestand die Gruppe 1 aus 6 Knochenproben, Gruppe 2 aus 7 Knochenproben und Gruppe 3 aus 7 Knochenproben.

Am 9. und am 21. Versuchstag musste jeweils eine Knochenprobe der Gruppe 2 aufgrund einer Infektion aus dem Experiment ausscheiden.

Alle Knochenproben wurden am 16. Versuchstag mit Calcein, am 35. Versuchstag ebenfalls mit Calcein und am 45. Versuchstag mit Alizarin Complexone gefärbt (siehe Kapitel 2.4.3).

Am 25. Versuchstag wurden Proben zur Messung von Pg E2 entnommen. Am 38. Versuchstag wurden, zusätzlich zu den Pg E2 Proben, Proben zur Messung von TNF- α , IL-6 und Osteoprotegerin entnommen (siehe Kapitel 2.4.4).

3.1.2 pH-Wert

Der pH-Wert des verbrauchten Mediums wurde jeweils nach dem Mediumwechsel bestimmt, um die Pufferkapazität des Mediums zu prüfen.

Die pH-Werte lagen bei allen Messungen zwischen einem Minimum von 7,1 und einem Maximum von 7,42.

Der gewählte Toleranzbereich von pH 7,10 bis 7,50 wurde in keinem Fall über- oder unterschritten, womit das verwendete Kulturmedium in Bezug auf seine Pufferkapazität als geeignet angesehen werden kann.

Histologie Mason-Goldner-Färbung

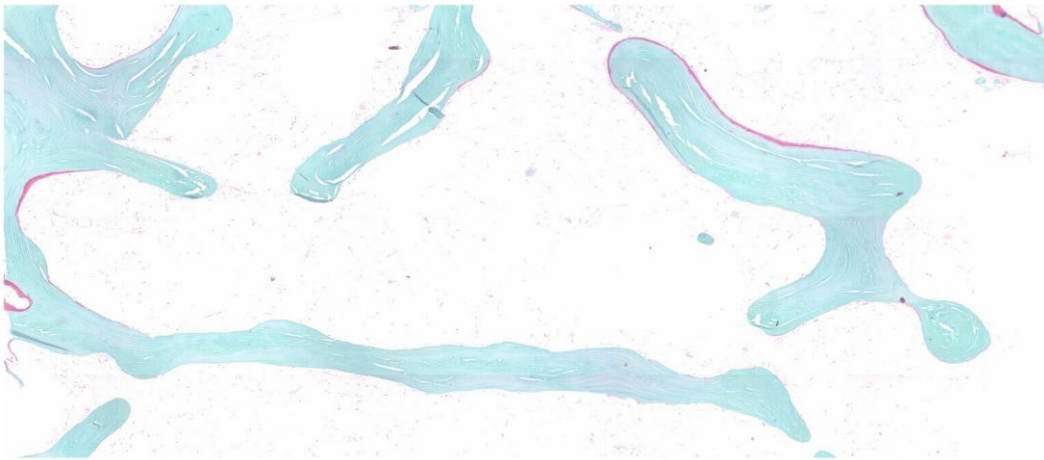


Abb. 3.1 Präparatausschnitt Kontrollgruppe

(40-fache Vergrößerung)



Abb. 3.2 Präparatausschnitt 2000-µstrain-Gruppe

(40-fache Vergrößerung)

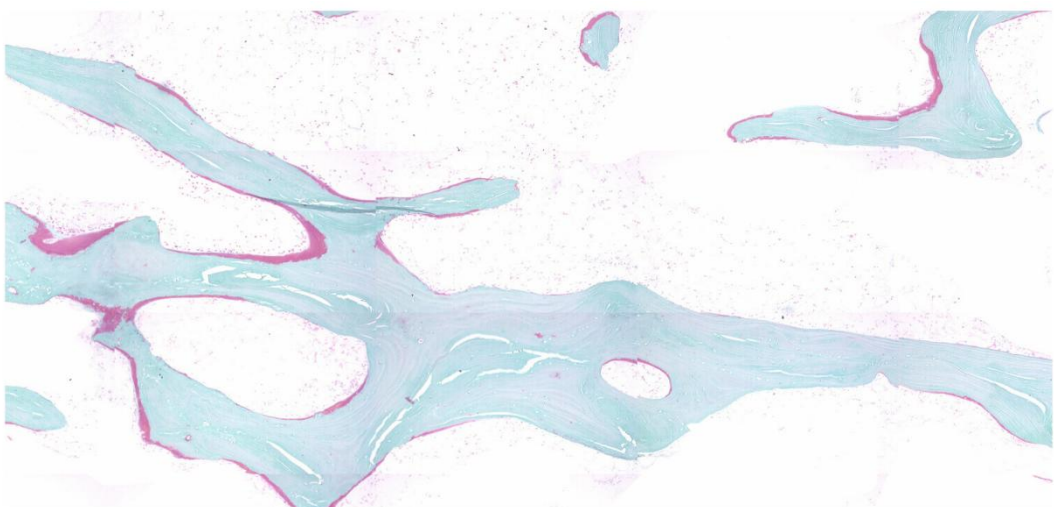


Abb. 3.3 Präparatausschnitt 4000-µstrain-Gruppe

(40-fache Vergrößerung)

3.2.1 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Messungen der Mason-Goldner-Färbung waren nicht normal verteilt. Dies ist nachfolgend in den Boxplots erkennbar. Aus diesem Grunde wurden die Gruppen mittels Kruskal-Wallis-H-Test auf signifikante Unterschiede geprüft (siehe Kapitel 2.7).

3.2.2 Osteoid im Verhältnis zum Totalvolumen

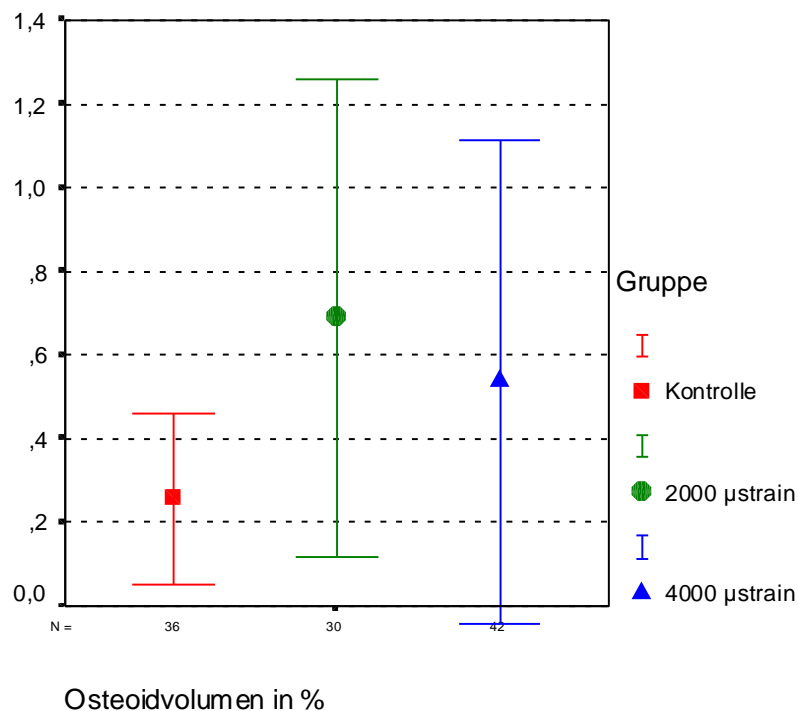


Abb. 3.4 Mittelwerte des Osteoidvolumens in Bezug auf das Gesamtvolumen mit der dazugehörigen Standardabweichung in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

Die Messung der Osteoidfläche in Bezug auf die Gesamtfläche der ausgemessenen Knochenschnitte zeigt, dass in den beiden belasteten Gruppen signifikant mehr Osteoid gebildet wurde als in der Kontrollgruppe ($p = 0,015$).

Zwischen den beiden Belastungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,131$).

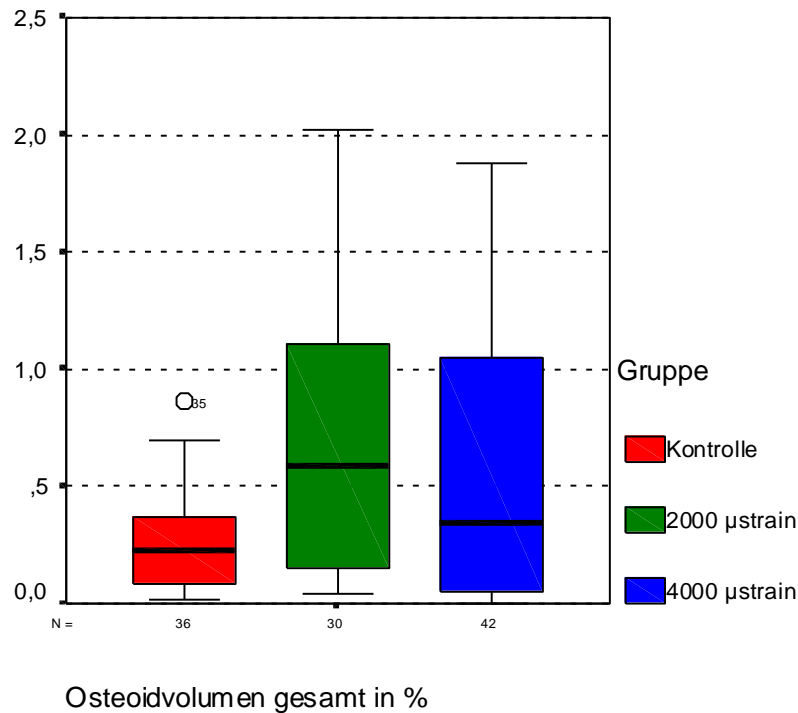


Abb. 3.5 Darstellung des Osteoidvolumens der Gruppen als Boxplot mit Median, 25% und 75% Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern. Werte in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

Die Abbildung 3.4 zeigt eine deutlich höhere Osteoidproduktion in den Belastungsgruppen als in der Kontrollgruppe. Die unterschiedliche Höhe der Kompression hat jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Menge des gebildeten Osteoids. Beide Belastungshöhen stimulieren die Osteoidbildung, was zeigt, dass sich die gewählte Belastung im physiologischen Bereich befand, da man bei einer zu hohen Belastung einen vermehrten Abbau des Knochens erwarten würde.

Abbildung 3.5 verdeutlicht jedoch, dass die verschiedenen Knochenproben der Belastungsgruppen sehr inhomogen auf die Kompression reagierten. Dies führte zu einer weiten Streuung der Werte.

3.2.3 Osteoid im Verhältnis zum verkalkten Knochen

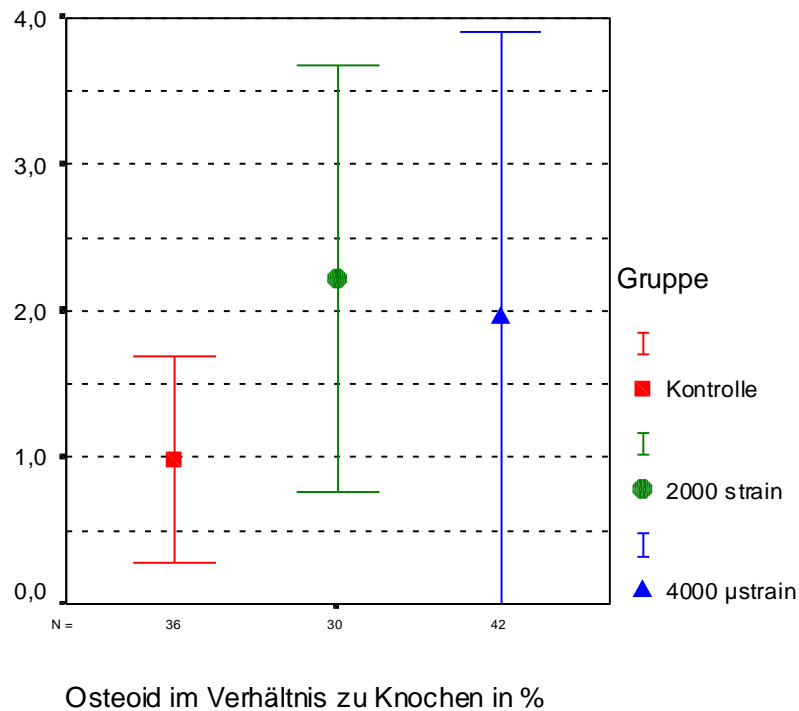


Abb. 3.6 Mittelwerte des Osteoidvolumens in Bezug auf das Knochenvolumen mit der dazugehörigen Standardabweichung in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

Das Verhältnis von Osteoid zu verkalktem Knochen bestätigt das Ergebnis der Messung des gesamten Osteoids.

In den beiden belasteten Gruppen wurde signifikant mehr Osteoid neu gebildet als in der Kontrollgruppe ($p = 0,008$).

Zwischen den beiden Belastungsgruppen kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,162$).

Die Abbildungen 3.6 und 3.7 zeigen den deutlichen Unterschied zwischen den Belastungsgruppen und der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte der Belastungsgruppen sind mehr als doppelt so hoch wie die der Kontrollgruppe.

Die Variationen der gemessenen Werte innerhalb der Gruppen sind in den belasteten Gruppen jedoch deutlich ausgeprägter.

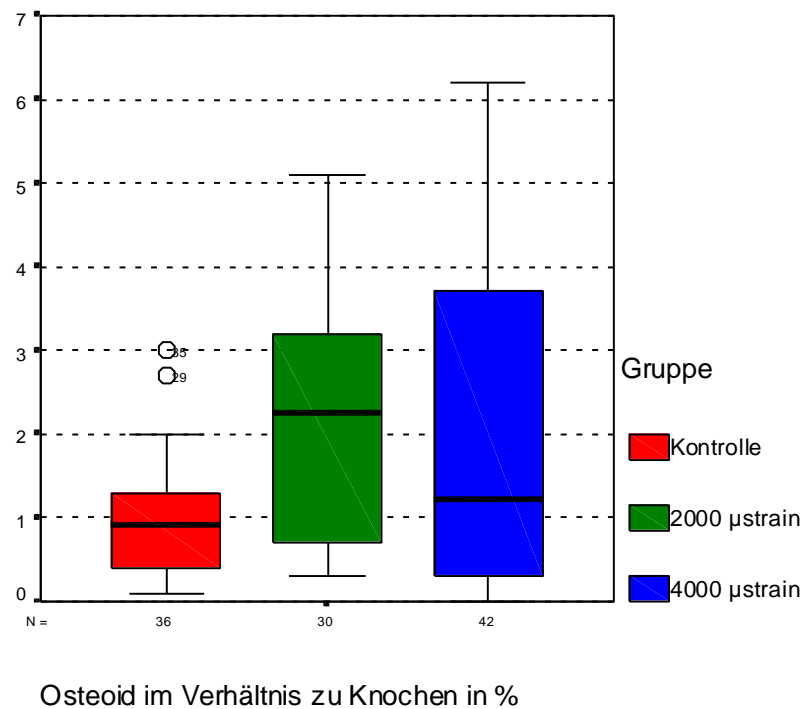


Abb. 3.7 Darstellung des Osteoidvolumens der Gruppen im Verhältnis zum Knochenvolumen als Boxplot mit Median, 25% und 75% Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern. Werte in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

3.2.4 Aktive Knochenoberfläche

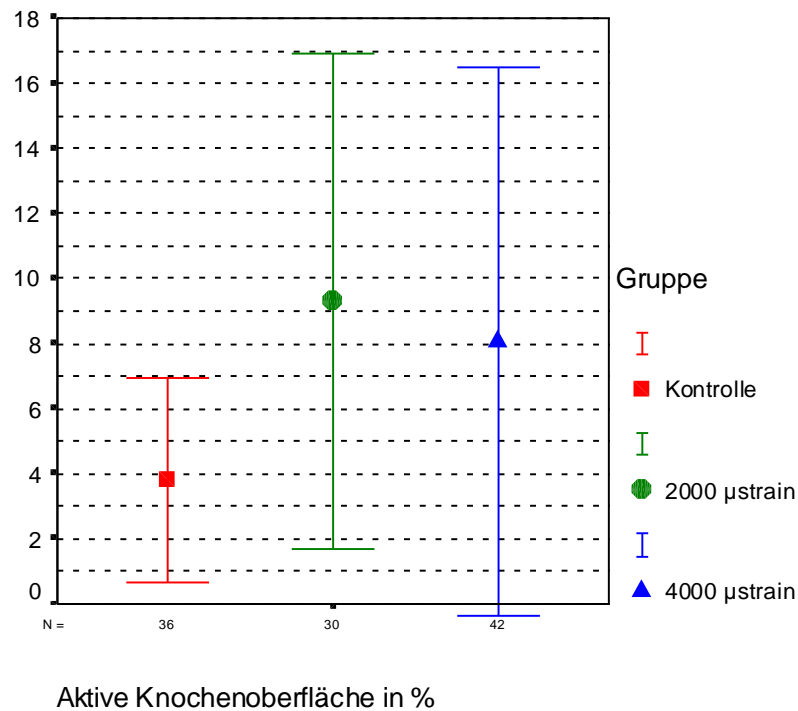


Abb. 3.8 Mittelwerte der aktiven Knochenoberfläche der Knoch trabekel mit der dazugehörigen Standardabweichung in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

Die aktive Knochenoberfläche gibt prozentual die Oberfläche der Trabekel an, auf der eine Osteoidschicht nachweisbar ist. Normalerweise ist ca. 4% - 5% der Oberfläche von trabekulärem Knochen mit aktiven, Osteoid produzierenden Osteoblasten besetzt (30). Diese Aussage kann hier bestätigt werden, da in der Kontrollgruppe eine aktive Knochenoberfläche von 3,80% (Mittelwert) nachweisbar ist.

Die beiden Belastungsgruppen zeigen im Mittel mit 9,32% in Gruppe 2 und 8,06% in Gruppe 3 eine mehr als doppelt so große aktive Knochenoberfläche.

Die Belastungsgruppen besitzen eine signifikant größere aktive Knochenoberfläche als die Kontrollgruppe ($p = 0,027$). Zwischen den beiden Belastungsgruppen kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,235$).

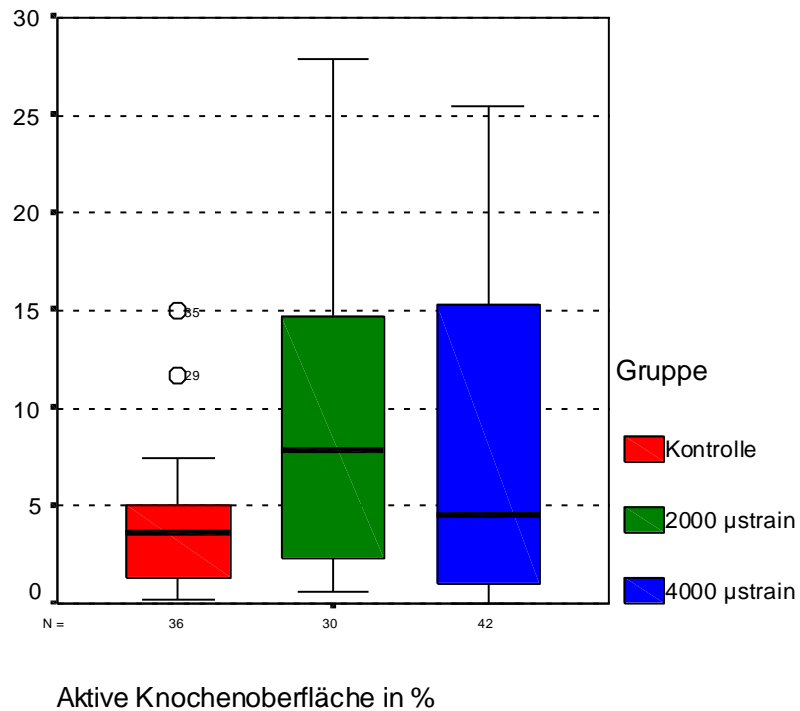
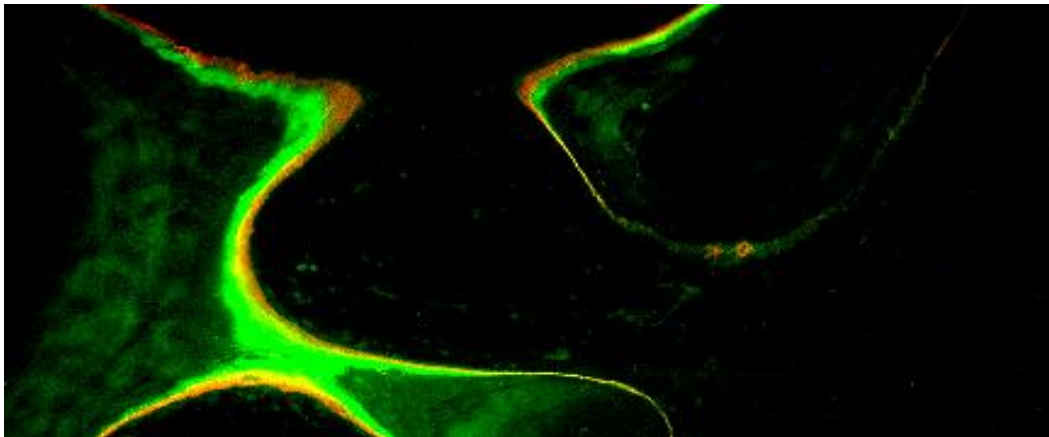


Abb. 3.9 Darstellung der aktiven Knochenoberfläche der Gruppen als Boxplot mit Median, 25% und 75% Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern. Werte in Prozent.
N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

Wie auch bei den Osteoidmessungen zeigt sich hier in der Boxplotdarstellung eine inhomogene Verteilung der Messwerte innerhalb der Belastungsgruppen.

Die Zunahme der aktiven Knochenoberfläche innerhalb der Belastungsgruppen zeigt jedoch, dass die gewählte Kompression zu einer vermehrten Aktivierung von Osteoblasten und Vorläuferzellen geführt haben muss.

Histologie Fluoreszenz-Färbung

Abb. 3.10 Fluoreszenz-Färbung 2000- μ strain-Gruppe

(80-fache Vergrößerung)

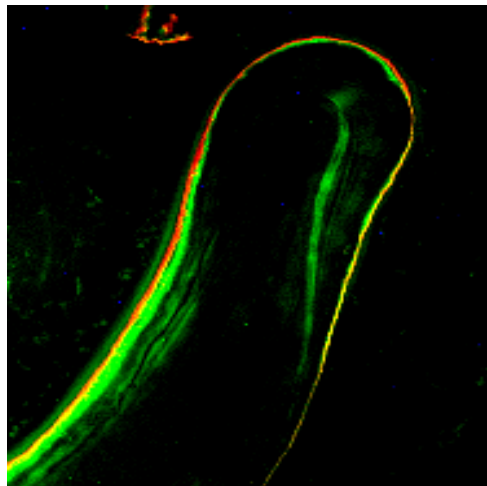
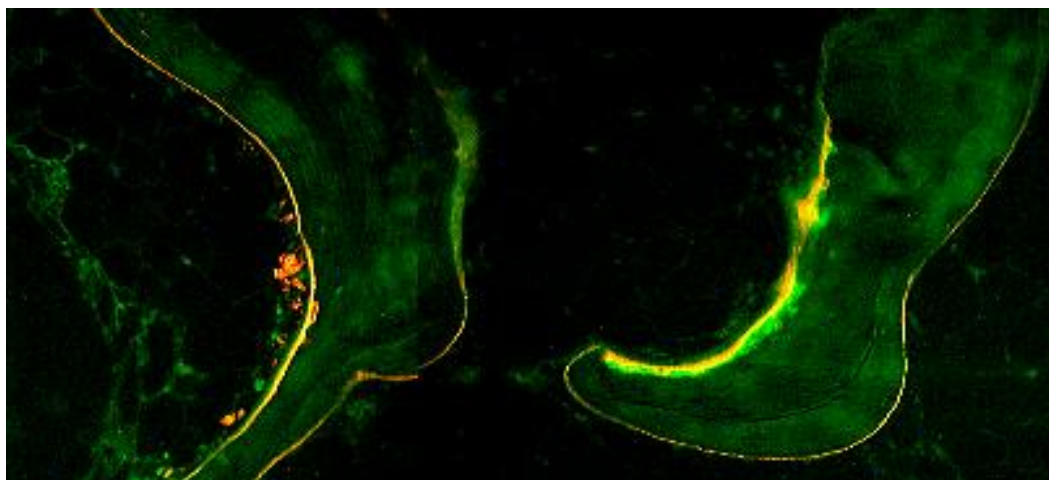
Abb. 3.11 Fluoreszenz-Färbung 4000- μ strain-Gruppe
(80-fache Vergrößerung)

Abb. 3.12 Fluoreszenz-Färbung Kontroll-Gruppe

(40-fache Vergrößerung)

3.3.1 Calcein im Verhältnis zum verkalkten Knochen

Das eingelagerte Calcein wurde prozentual im Verhältnis zum verkalkten Knochen berechnet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Alle Knochenproben lagerten Calcein ein.

Kontrolle: Calcein/bonevol = 0,0511 % \pm 0,0194 %

2000 μ strain: Calcein/bonevol = 0,0434 % \pm 0,0261 %

4000 μ strain: Calcein/bonevol = 0,0606 % \pm 0,0364 %

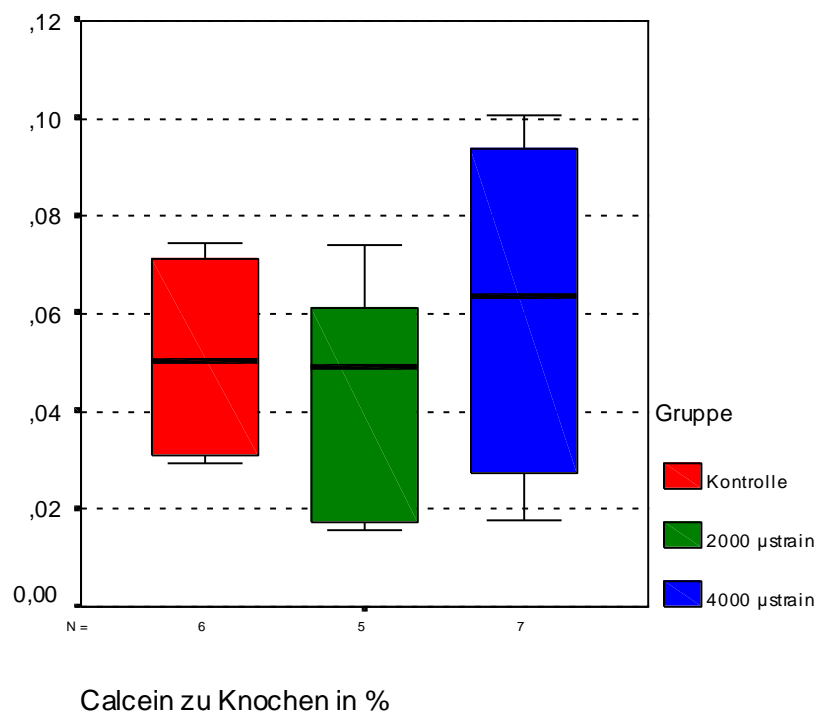


Abb. 3.13 Darstellung des Calceins der Gruppen im Verhältnis zum Knochenvolumen als Boxplot mit Median, 25% und 75% Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern. Werte in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

3.3.2 Alizarin im Verhältnis zum verkalkten Knochen

Das eingelagerte Alizarin wurde prozentual im Verhältnis zum verkalkten Knochen berechnet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Alle Knochenproben lagerten Alizarin ein.

Kontrolle: Alizarin/bonevol = 0,0405 % \pm 0,0309 %

2000 μ strain: Alizarin/bonevol = 0,0264 % \pm 0,0149 %

4000 μ strain: Alizarin/bonevol = 0,0238 % \pm 0,0187 %

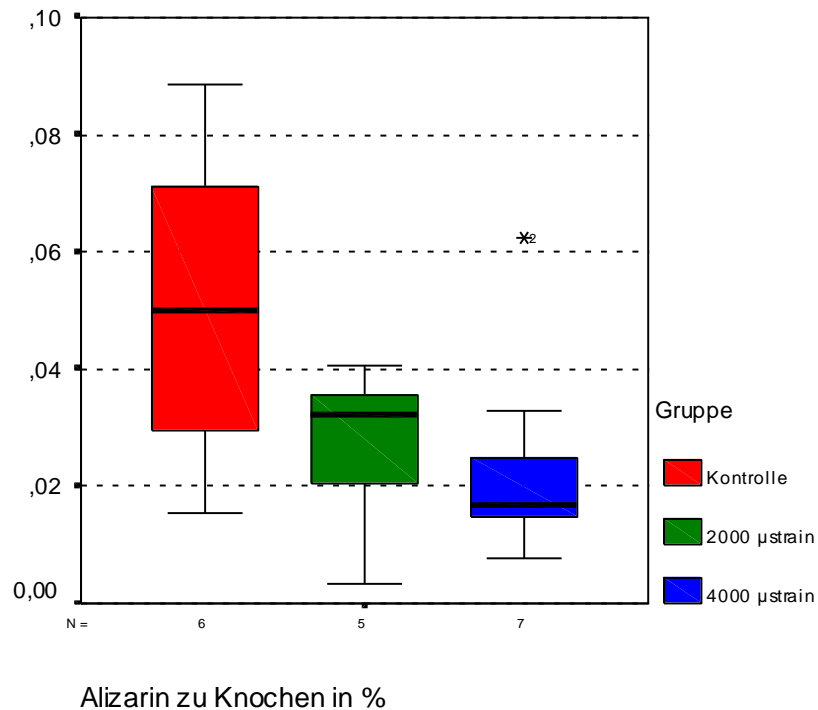


Abb. 3.14 Darstellung des Alizarins der Gruppen im Verhältnis zum Knochenvolumen als Boxplot mit Median, 25% und 75% Quartil, Minimum, Maximum und Ausreißern. Werte in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Knochenschnitte

3.3.3 Wachstumsrate – Mineral Apposition Rate

Die durchschnittliche Wachstumsrate der einzelnen Gruppen betrug:

Gruppe	MAR in μ m/Tag	Standardabweichung
Kontrolle	0,66635	0,4089
2000 μ strain	0,61657	0,2887
4000 μ strain	0,53366	0,2959

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Insgesamt zeigte sich eine durchschnittliche MAR von 0,59526 μ m/Tag (bei einer SA von 0,30813).

3.4 Lokale Mediatoren

Pg E2, IL-6, TNF- α und Osteoprotegerin wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Am 25. und 38. Versuchstag wurden Proben des Kulturmediums zur Untersuchung der Pg E2 Konzentration entnommen. Bestimmt wurden die Werte 1, 5, 6, 7, 11 und 12 Stunden nach der regulären Belastung.

Am 38. Versuchstag wurden Proben des Kulturmediums zur Untersuchung von IL-6, TNF- α und Osteoprotegerin entnommen. Bestimmt wurden die Werte 1, 5, 7 und 12 Stunden nach Belastung der Knochenproben.

Um eine genügend hohe Konzentration zu erreichen, wurde das Medium jeweils über eine Stunde gesammelt (siehe Kapitel 2.4.4).

Aus der Kontrollgruppe wurden bei 3 Knochenproben die Konzentrationen der Mediatoren gemessen. In den Belastungsgruppen wurden bei allen Knochenproben die Konzentrationen gemessen. In Gruppe 3 konnten bei einer Knochenprobe die Mediatoren aufgrund eines Probeentnahmefehlers nicht bestimmt werden.

Die Anzahl der gemessenen Proben ist in den Grafiken mit N angegeben.

Bei der Bestimmung des Osteoprotegerin wurden keine messbaren Mediatorenkonzentrationen erreicht, sodass hier keine Auswertung erfolgen konnte.

3.4.1 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messungen der lokalen Mediatoren führte zu normal verteilten Ergebnissen. Aus diesem Grund wurden die Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (Post-Hoc-Test nach Bonferroni) auf signifikante Unterschiede geprüft.

3.4.2 Prostaglandin E2 (25. Versuchstag)

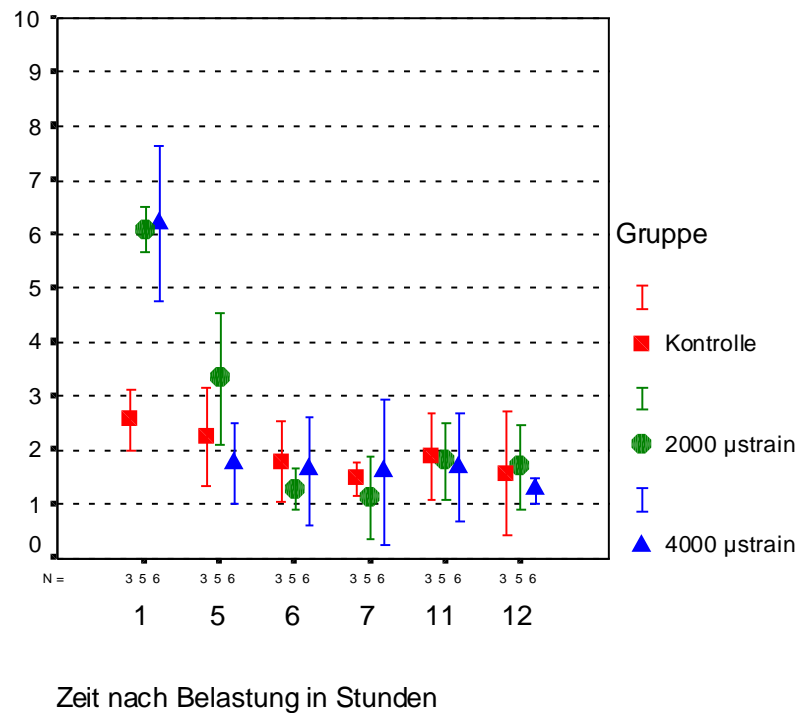


Abb. 3.15 Verlauf der Mittelwerte von Pg E2 über die Zeit, angegeben als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichung in Prozent. N = Anzahl der ausgewerteten Proben

Der Verlauf von Pg E2 über die Zeit zeigt einen deutlichen Anstieg der Werte innerhalb der beiden Belastungsgruppen in der ersten Stunde auf über 6 ng/ml. Die Werte sind signifikant höher als die der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Die Werte der Belastungsgruppen sind nach einer Stunde auch gegenüber den Werten der Belastungsgruppen nach fünf Stunden deutlich erhöht ($p < 0,05$).

Zwischen den beiden Belastungsgruppen findet sich kein signifikanter Unterschied der gemessenen Werte.

Die Signifikanzen zum Messzeitpunkt Stunde 1 sind im Einzelnen:

Gruppe 1 zu Gruppe 2 $p = 0,002$

Gruppe 1 zu Gruppe 3 $p = 0,001$

Gruppe 2 zu Gruppe 3 $p = 1,000$

Im weiteren Verlauf sanken die Werte nach der ersten Stunde deutlich ab.

Wie Abbildung 3.10 zeigt, ist der Pg E2 Wert in Gruppe 2 nach fünf Stunden noch leicht erhöht, es kann aber kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen mehr festgestellt werden.

Zu den Messzeitpunkten 6, 7, 11 und 12 Stunden befinden sich alle Mittelwerte der verschiedenen Gruppen zwischen 1,11 und 1,88 ng/ml.

Dies kann als Baseline der Pg E2 Ausschüttung innerhalb einer Stunde angesehen werden.

3.4.3 Prostaglandin E2 (38. Versuchstag)

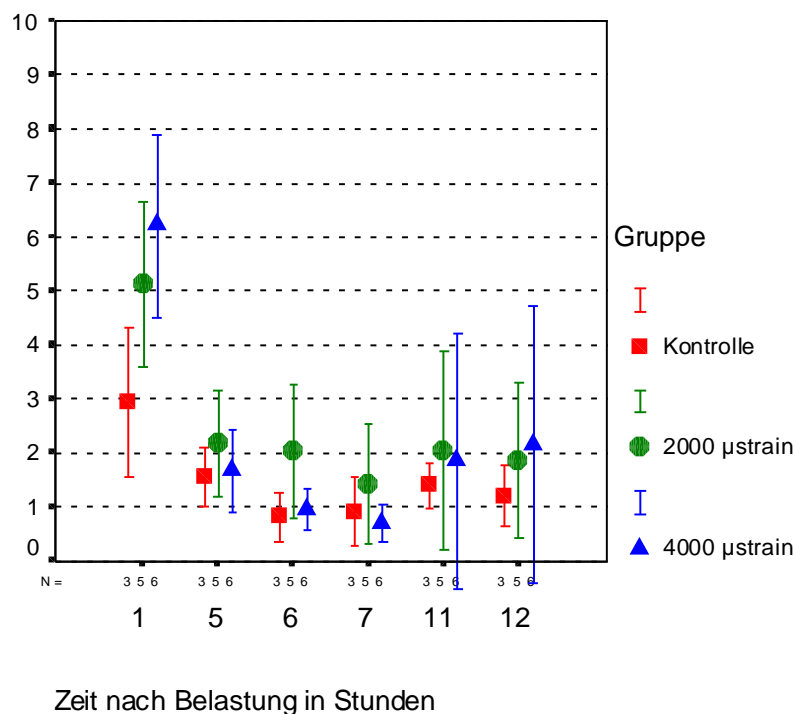


Abb. 3.16 Verlauf der Mittelwerte von Pg E2 über die Zeit, angegeben als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen. N = Anzahl der gemessenen Proben.

Die Ergebnisse der zweiten Messung von Pg E2 bestätigen die Ergebnisse der ersten Messung.

Auch hier zeigt der Verlauf von Pg E2 über die Zeit einen deutlichen Anstieg der Werte innerhalb der beiden Belastungsgruppen in der ersten Stunde auf Werte größer als 5 ng/ml (2000 µstrain) und größer 6 ng/ml (4000 µstrain). Die Werte sind signifikant höher als die der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

Die Werte der Belastungsgruppen sind nach einer Stunde auch gegenüber den Werten der Belastungsgruppen nach fünf Stunden deutlich erhöht ($p < 0,05$).

Zwischen den beiden Belastungsgruppen findet sich kein signifikanter Unterschied der gemessenen Werte.

Die Signifikanzen zum Messzeitpunkt Stunde 1 sind im Einzelnen:

Gruppe 1 zu Gruppe 2 $p = 0,002$

Gruppe 1 zu Gruppe 3 $p = 0,001$

Gruppe 2 zu Gruppe 3 $p = 1,000$

Wie Abbildung 3.11 zeigt, sind auch bei dieser Messung die Werte nach fünf Stunden deutlich abgesunken. Hier bewegen sich die Mittelwerte aller Gruppen in einem Bereich zwischen 0,7 und 2,15 ng/ml zwar weiter gestreut als in der ersten Messung, sie sind aber deutlich niedriger als in der ersten Stunde.

3.4.4 Interleukin-6 (38. Versuchstag)

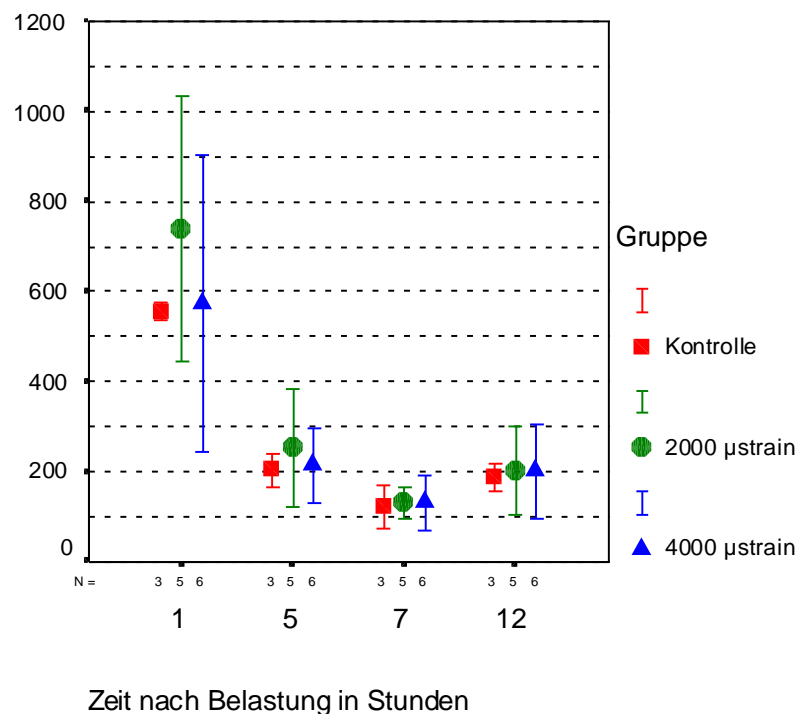


Abb. 3.17 Verlauf der Mittelwerte von IL-6 über die Zeit, angegeben als Mittelwerte mit den dazugehörige Standardabweichungen. N = Anzahl der gemessenen Proben.

Der Verlauf der IL-6 Werte in Abbildung 3.12 zeigt einen deutlichen Anstieg innerhalb der ersten Stunde bei allen Gruppen.

Die Werte sind gegenüber den Werten nach fünf Stunden signifikant erhöht ($p < 0,05$). Zwischen den Gruppen ist zu keiner Stunde ein signifikanter Unterschied feststellbar. Nach einem Anstieg der Mittelwerte aller Gruppen auf Werte zwischen 556 – 738 pg/ml eine Stunde nach Belastung, liegen die Mittelwerte nach 5, 7, und 12 Stunden in allen Gruppen zwischen 129 – 251 pg/ml.

3.4.5 Tumornekrosefaktor- α (38. Versuchstag)

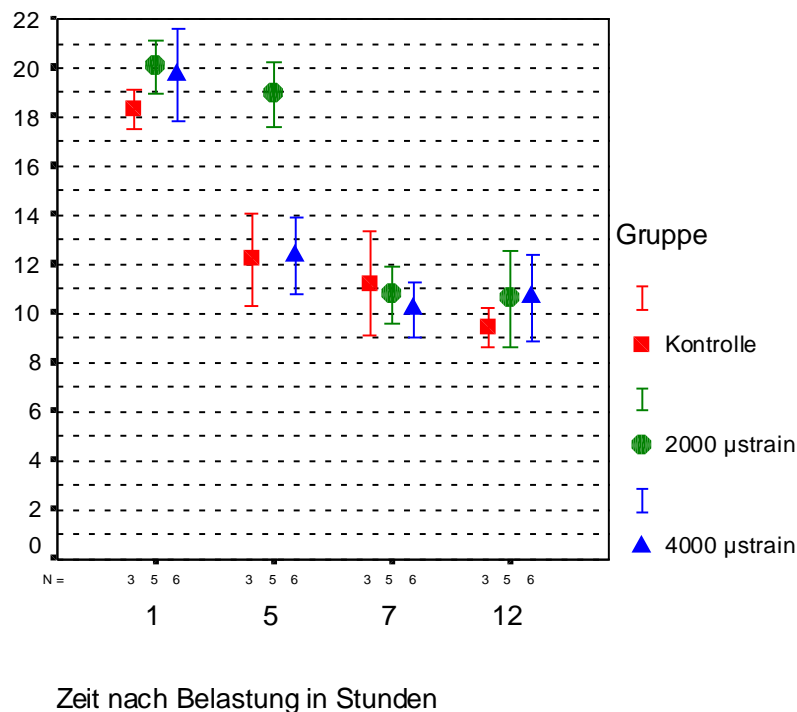


Abb. 3.18 Verlauf der Mittelwerte von TNF- α über die Zeit, angegeben als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen. N = Anzahl der gemessenen Proben.

Der Verlauf der TNF- α Werte in Abbildung 3.13 zeigt einen deutlichen Anstieg innerhalb der ersten Stunde bei allen Gruppen auf 18 – 20 pg/ml.

Die Werte von Gruppe 1 und Gruppe 3 sind gegenüber den Werten nach fünf Stunden signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Nach fünf Stunden ist der Wert von Gruppe 2 noch deutlich erhöht und zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Gruppen 1 und 3 ($p < 0,001$).

Nach 7 und 12 Stunden liegen die Mittelwerte aller Gruppen in einem ähnlichen Bereich zwischen 9,4 und 11,23 pg/ml. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mehr feststellbar.

3.5 E-Modul

Die Messung des E-Moduls der Knochenproben führte in diesem Versuch zu keinem verwertbaren Ergebnis.

Die Knochenproben wurden täglich entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit um 10 μm und um 20 μm komprimiert. Die hierfür benötigte Kraft wurde während der Kompression nach 15 Sekunden und nach 5 Minuten aufgezeichnet.

Diese Werte wurden zur Berechnung des E-Moduls verwendet (siehe Kapitel 2.1.4). Aufgrund der dynamischen Messung und der Aufzeichnung jeweils nur eines Wertes zum Messzeitpunkt waren die Messungen vermutlich ungenau und führten zu erheblichen Abweichungen über die Versuchsdauer.

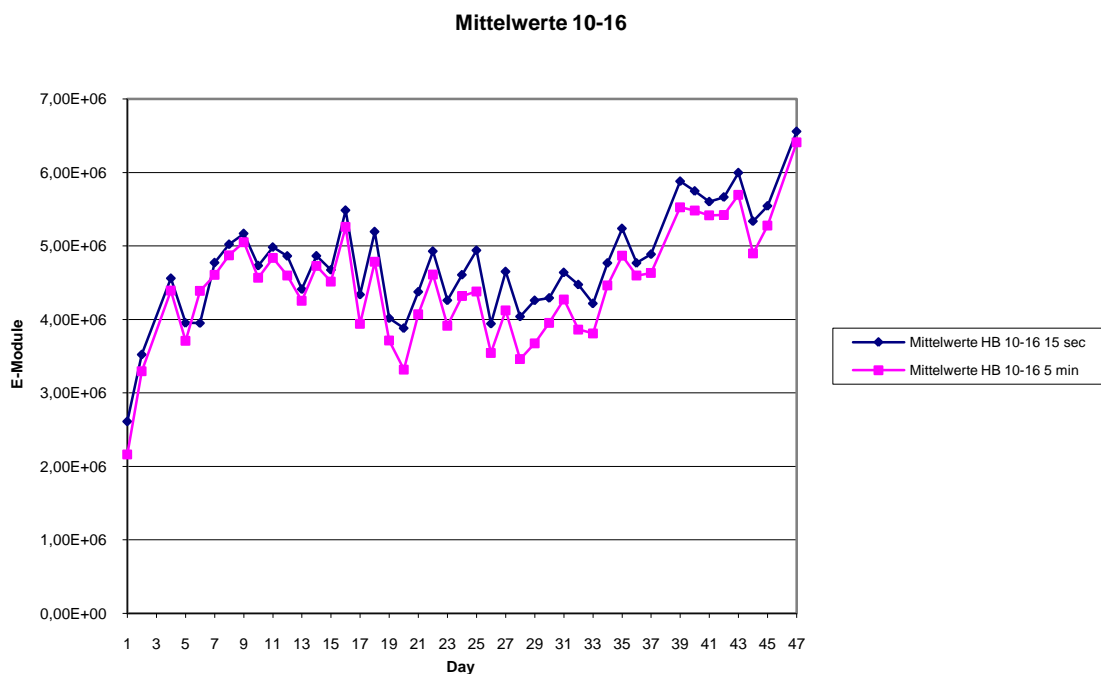


Abb. 3.19 Entwicklung des durchschnittlichen E-Moduls der 2000- μstrain -Gruppe über die Zeit. Darstellung der Mittelwerte nach 15 Sekunden und 5 Minuten.

Der sehr starke E-Modul Anstieg während der ersten drei Tage lässt sich dadurch erklären, dass die Knochenproben durch die Kompression vermutlich zuerst bis auf den Kammerboden der KBK gepresst wurden. Erst nachdem sich die Knochenproben in ihrer endgültigen Lage in der KBK befanden, war es möglich, Kraft und Kompression genauer zu bestimmen. Aufgrund von Kalibrierungsschwankungen des Systems wurde vermutlich nicht die angegebene Kompression auf die Knochenproben aufgebracht. In der späteren Weiterentwicklung des Systems konnte

gezeigt werden, dass ein Teil der Kompression vom Rahmen des ZETOS absorbiert wurde. Hier wurde die Rahmensteifigkeit der Konstruktion geändert. Die Absorptionseffekte konnten hierdurch in nachfolgenden Versuchen quantifiziert werden. Durch diesen Systemfehler zeigten sich in diesem Versuch deutliche Schwankungen der Messwerte. Eine genaue Aussage über die Entwicklung der E-Module konnte hier nicht getroffen werden. Aus diesem Grund wurden die E-Modul Werte hier nicht weitergehend ausgewertet.

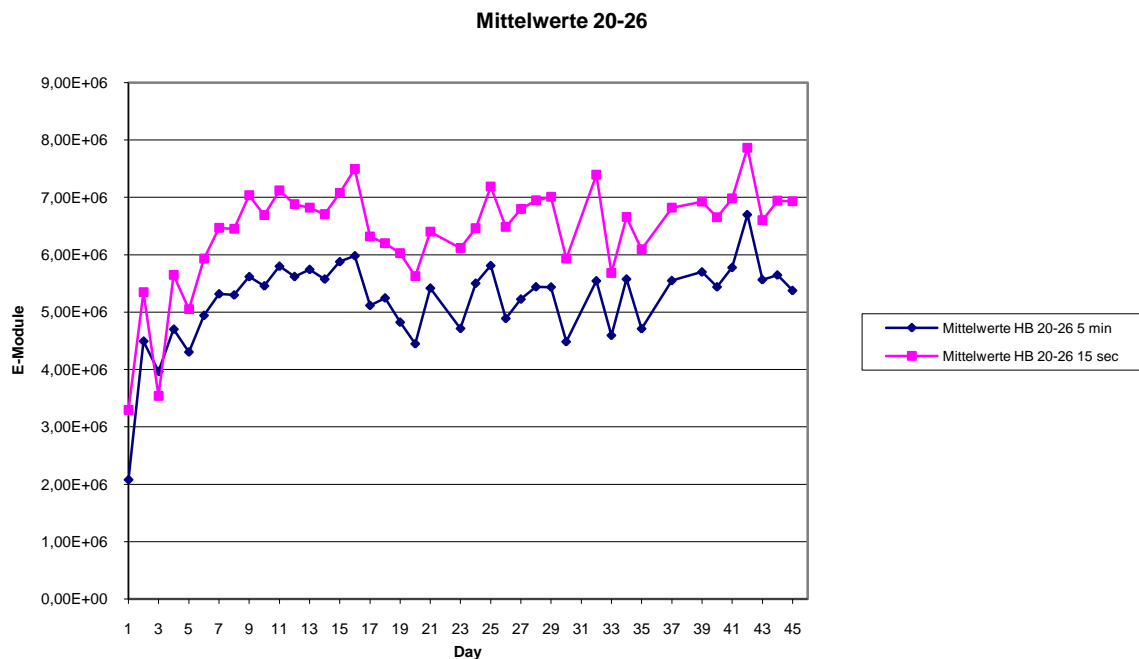


Abb. 3.20 Entwicklung des durchschnittlichen E-Moduls der 4000- μ strain-Gruppe über die Zeit
Darstellung der Mittelwerte nach 15 Sekunden und 5 Minuten

Die aufgezeichneten Werte für die Kräfte, die zur Kompression der Knochenproben aufgewendet wurden, lagen in der 2000- μ strain-Gruppe zwischen 50 Newton und 112 Newton (Mittelwert: 85 Newton). In der 4000- μ strain-Gruppe lagen die Werte für die aufgewendete Kraft zwischen 137 Newton und 236 Newton (Mittelwert: 183 Newton). Als physiologischer Bereich für die trabekulären Knochenproben aus dem Hüftkopf war zuvor eine Krafteinwirkung von 25 Newton bis 280 Newton definiert worden (siehe Kapitel 2.1.5).

4 Diskussion

4.1 Das ZETOS-System

Das hier vorgestellte Kultur- und Belastungssystem ZETOS ermöglicht es erstmals, humane, trabekuläre Knochenproben über mehrere Wochen unter physiologischen Bedingungen in Kultur zu halten und diese gleichzeitig mit physiologischen Belastungsreizen mechanisch zu stimulieren.

Der Einfluss von definierter mechanischer Belastung auf trabekulären Knochen kann anhand der Messung verschiedenster Mediatoren und durch die spätere histologische Aufarbeitung der Knochenproben genau beurteilt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass mit dem Kultur- und Belastungssystem eine adäquate physiologische Belastung der Knochenproben erreicht werden konnte. Das verwendete Kulturmedium und die gewählte Mediumflussrate führten zu einer ausreichenden Nährstoffversorgung der Knochenproben. Dies war daran feststellbar, dass in den Belastungsgruppen eine signifikante Zunahme von Osteoid und aktiver Knochenoberfläche beobachtet wurde. Durch die Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung konnte dies bestätigt werden. Das nachweisbare Knochenwachstum spricht gegen eine erhöhte Apoptoserate der Osteoblasten während des Versuchs. Ebenso sprechen die von den Knochenzellen gebildeten und hier im Versuchsverlauf bestimmten Mediatoren für das Vorliegen von vitalem und aktivem Gewebe. Ein vermehrter Knochenabbau war histologisch nicht nachweisbar. Die Pufferwirkung des Mediums war optimal, da sich der pH-Wert nach zwei Kulturtagen während des gesamten Versuchs im Bereich von 7,1 – 7,5 befand. Eine Zellschädigung war innerhalb dieses Toleranzbereichs nicht feststellbar.

Es bleibt jedoch fraglich, ob die Zusammensetzung des Kulturmediums zu einer Stimulation des Knochenstoffwechsels geführt hat, da in allen Gruppen ein Knochenwachstum nachweisbar war. In den belasteten Gruppen stieg zwar die Osteoidmenge und die aktive Knochenoberfläche, die MAR der unbelasteten Gruppe war jedoch ähnlich der MAR der belasteten Gruppen, sodass auch hier von einem Knochenwachstum ausgegangen werden muss.

Die Zytokinmessung ergab erhöhte Werte von IL-6 und TNF- α eine Stunde nach dem ersten Mediumwechsel in der Kontrollgruppe. Die Ursache hierfür sollte in einem weiteren Versuch untersucht werden, in welchem die Auswirkungen

verschiedener Zusammensetzungen des Kulturmediums verglichen werden sollten. DMEM plus 10% FCS wird sehr häufig in Zellkulturen von humanem Knochen verwendet (20,39,104,144). Die hier angegebene Zusammensetzung des Kulturmediums (siehe Kapitel 2.2.) wurde in Vorversuchen an überwiegend bovinem Knochen entwickelt. Die optimale Nährstoffzusammensetzung für Versuche mit humanem Knochen ist Gegenstand weiterer Arbeiten an diesem System.

Ein Vergleich des Einflusses der mechanischen Belastung auf die Knochenproben war hier dennoch möglich, da alle Knochenproben mit dem gleichen Kulturmedium versorgt wurden und es deutliche Unterschiede zwischen den Belastungsgruppen und der Kontrollgruppe gab.

Bisher wurde in der Literatur eine Reizschwelle von 1000 μ Strain für das appositionelle Knochenwachstum beschrieben (33,34), wobei eine Belastung von mehr als 5000 μ Strain zu Mikrofrakturen im trabekulären Knochen und zu dessen Abbau führte. Eine physiologische Belastung der Knochenproben wurde hier mit 2000 μ Strain und 4000 μ Strain für die Belastungsgruppen festgelegt.

Die Zunahme von Osteoid und der aktiven Knochenoberfläche innerhalb der Belastungsgruppen und die Zunahme der parakrinen Mediatoren nach der Belastung zeigten, dass eine physiologische Belastung von der ZETOS-Belastungseinheit auf die Knochenproben übertragen wurde. Aufgrund von Kalibrierungsschwankungen bleibt hier jedoch unklar, mit welcher Kompression die Knochenproben genau belastet wurden. Die vom Aktuator ausgeführte Längenänderung wurde vermutlich nicht mit dem gleichen Betrag auf die Knochenproben übertragen. Mechanische Verluste, wie z.B. durch anfänglich nicht optimal am Kammerboden aufliegende Knochenproben verringerten zusätzlich die Höhe der aufgebrachten Kompression. Des Weiteren wurde ein Teil der Kompression durch die Rahmenkonstruktion absorbiert, wie sich in der späteren Weiterentwicklung des Systems gezeigt hat. Durch eine Versteifung der ZETOS Belastungseinheit konnte dieser Systemfehler kontrolliert werden. Eine Quantifizierung der Absorption wurde in späteren Versuchen möglich.

Die Messung der aufgewendeten Kräfte erfolgte in diesem Versuch mittels einer kommerziellen Kraftmessplatte (Kistler, Schweiz). Diese Kraftmesser sind von der Vertreiberfirma kalibriert und als zuverlässig anzusehen. Im vorliegenden Versuch bewegten sich die gemessenen Kräfte durchschnittlich zwischen 50 - 236 Newton.

Dies ist in der zuvor angestellten Berechnung der Kraftverteilung innerhalb des Hüftkopfs als physiologischer Bereich festgelegt worden (siehe Kapitel 2.1.5). Aus diesem Grund kann hier sicher von einer physiologischen Belastung der Knochenproben in beiden Gruppen ausgegangen werden. Eine quantitative Unterscheidung der Belastungshöhen zwischen den Gruppen ist hier retrospektiv nicht sicher möglich. Dies spiegelt sich auch in den vorliegenden Ergebnissen wieder. Sowohl die histologische Auswertung als auch die laborchemische Messung der lokalen Mediatoren zeigten deutliche Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Belastungsgruppen. Zwischen den beiden Belastungsgruppen waren jedoch in allen Auswertungen keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Die Bestimmung der E-Module der Knochenproben und deren Veränderungen konnten in diesem Versuch nicht verwertet werden, da die hier verwendete Messmethode zu großen Schwankungen führte. Das E-Modul wurde in diesem Versuch dynamisch während der Belastung nach 15 Sekunden und 5 Minuten bestimmt. Die dynamische Messung führte zu Ungenauigkeiten bei der Aufzeichnung der Kraft. Durch die teilweise inadäquate Kompression der Knochenproben kam es zu einer hohen Schwankungsbreite bei der Aufzeichnung der erforderlichen Kräfte. Da die Kraft im Laufe der Belastung nur zu zwei Zeitpunkten einmalig gemessen und aufgezeichnet wurde, variierten die errechneten Werte für die E-Module erheblich (siehe Kapitel 3.4). Für nachfolgende Versuche wurde aus diesem Sachverhalt heraus das Verfahren der Quasi-Statistischen-Belastung entwickelt. Hierbei wird das E-Modul für die Knochenproben vor oder nach der Kompression separat gemessen. Die Kraft, welche auf den Probenkörper wirkt, wird über 30 Sekunden gleichmäßig gesteigert, z.B. 300 – 1000 Newton. Das Maximum wird zuvor festgelegt, um die Probe nicht über die Frakturgrenze hinaus zu belasten. Kraft und Kompression werden währenddessen simultan gemessen.

Um nun die scheinbare Steifigkeit der Knochenzylinder zu berechnen, wird der reziproke Verlauf der Regressionslinie über ein frei wählbares Kraftintervall aufgetragen. Dies bedeutet, dass die scheinbare Steifigkeit aus der Ausgleichsgeraden der Kompressions-Kraft-Kurve errechnet wird. Der Vorteil hierbei liegt darin, dass eine große Anzahl von Daten (hier 300) in einem vorher festgelegten Kraftintervall bestimmt wird, anstatt nur einmalig punktuell bestimmte Werte zur Berechnung zu verwenden.

Die scheinbare Steifigkeit folgt aus der Steigung der Regressionsgeraden über diesen Werten. Das Programm errechnet die Steifigkeit in der Maßeinheit eines Elastizitäts-Moduls (E-Modul, Youngs-Modulus; Einheit: Mega Pascal (Mpa), Giga Pascal (Gpa)), indem es die zylindrischen Parameter Radius (r) und Höhe (h) zur Normalisierung verwendet. Auf diese Weise entsteht ein Wert, der unabhängig von seiner geometrischen Dimension als reine Materialkonstante gesehen werden kann.

Mit dem ZETOS-System kann man demnach für beliebige Materialien das E-Modul genau bestimmen.

Bei der Verwendung von trabekulärem Knochen sollte bedacht werden, dass sich alle Angaben auf die gesamte Knochenprobe beziehen. Die Auswirkung der Belastung auf die einzelnen Trabekel konnte, aufgrund der komplexen Struktur des spongiösen Knochens, in diesem Versuch nicht genauer untersucht werden. Daher ist es geplant, in folgenden Experimenten die Struktur der Knochenproben zu Beginn und zum Ende des Versuchs mittels eines Mikro-CTs darzustellen. Die Veränderung der Trabekelstruktur durch mechanische Belastung soll hierbei genauer beobachtet werden.

Die Vorteile des ZETOS-Systems liegen darin, dass vollständige Organproben von trabekulärem Knochen kultiviert und belastet werden können. Somit ist es möglich, nicht nur einzelne Zellarten von Knochenzellen, sondern alle Knochenzellen in ihrer normalen Umgebung und deren Zusammenspiel unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, humanen Knochen über mehrere Wochen im ZETOS-System zu kultivieren. Das nachweisbare Knochenwachstum und die Überlebensrate der Knochenproben beweist, dass hier physiologische Bedingungen simuliert werden konnten, und dass es möglich war, die Knochenproben in-vitro zu stimulieren.

Die Simulation verschiedener Belastungsmuster erlaubt die vielseitige Untersuchung des Wachstumsverhaltens von trabekulärem Knochen. Durch den geschlossenen Kulturmediumkreislauf können vom Knochen produzierte lokale Mediatoren sehr einfach gesammelt, entnommen und bestimmt werden. Die Ergebnisse der hier untersuchten Mediatoren zeigen, dass es in-vitro zu Interaktionen zwischen den einzelnen Knochenzellen gekommen sein muss. Es kann davon ausgegangen werden, dass die geänderten Belastungsbedingungen ein Remodeling (siehe Kapitel 1.3.) innerhalb der Knochenproben induziert haben. Die

hierfür notwendigen und hier nachgewiesenen parakrinen Mediatoren sowie die messbaren Osteoidauflagerungen lassen diesen Schluss zu.

Das ZETOS-System vereint hiermit die Vorteile von in-vivo und in-vitro Versuchen. Wie in Zellkulturverfahren ist es möglich, kontrollierte Kulturbedingungen zu schaffen und parakrin wirksame Mediatoren zu bestimmen. Gleichzeitig wird eine komplette Organprobe untersucht und die Interaktion zwischen den einzelnen Zellsystemen kann beurteilt werden. Hierbei besteht die Möglichkeit, die Ausschüttung der Mediatoren in Bezug zu den mikroskopischen Veränderungen der Proben qualitativ und quantitativ zu erfassen und zu beurteilen.

Nachteil der Arbeit an dem ZETOS-System war der große Zeitaufwand, welcher für die Belastung der Knochenproben nötig war. Da nur ein Belastungsmodul zur Verfügung stand, mussten sämtliche Proben nacheinander belastet werden. Dies führte vor allem bei der Messung der Prostaglandine und Zytokine zu einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand, da alle Probenentnahmen in Bezug auf die Belastungszeit protokolliert werden mussten.

Hier wäre es sicherlich sinnvoll, entweder das Wechseln der Proben zu automatisieren oder aber mehrere Belastungsmodule gleichzeitig zu verwenden. Dies war zum Versuchszeitpunkt nicht möglich, da sich das System noch in der Entwicklung befand.

Die im vorliegenden Versuch festgestellte Problematik der Kalibrierung des Systems und der damit verbundenen schwankenden Kompression der Knochenproben wurde mittlerweile behoben. Ebenso wurde das Verfahren der Bestimmung des E-Modul zugunsten einer quasi-statischen Messung, wie oben erläutert, geändert. Hier wurden bereits Folgeversuche mit konstanten Werten durchgeführt (10,62).

4.2 Histologie

Die histologische Aufarbeitung und Auswertung der Knochenproben zeigte, dass die mechanische Belastung zu einem vermehrten Knochenum- und Knochenanbau geführt hat. Sowohl in der Mason-Goldner-Färbung als auch in der polychromen Sequenzmarkierung konnte ein appositionelles Knochenwachstum nachgewiesen werden.

Die Auswertung der Mason-Goldner-Färbung ergab eine vermehrte Osteoidbildung und eine Zunahme der aktiven Knochenoberfläche der Knochenproben der Belastungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen den beiden Belastungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die Osteoidbildung war innerhalb der Belastungsgruppen insgesamt und im Verhältnis zum trabekulären Knochen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,015$).

In der Kontrollgruppe konnte eine aktive Knochenoberfläche von 3,80 % bestimmt werden. Duncan & Turner stellten fest, dass ca. 5 % der Knochenoberfläche aktiv am Knochenaufbau teilnehmen (30). In den Belastungsgruppen hatte sich die aktive Knochenoberfläche mehr als verdoppelt und war signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,027$). Dies lässt den Schluss zu, dass vermehrt Bone Lining Cells in Osteoblasten umgewandelt wurden oder aber vermehrt Vorläuferzellen rekrutiert wurden. Vermutlich trifft beides zu. Die Vorläuferzellen mussten hierbei aus dem Knochen selbst stammen, da keine Blutversorgung des Knochens mehr bestand, über welche die Vorläuferzellen hätten einwandern können. Die Mechanosensitivität von Bone Lining Cells und Osteozyten konnte in-vivo gezeigt werden (7,28,92).

Die Vermutung, dass Knochen seine mechanosensitiven Eigenschaften im Alter nicht verliert (63), konnte hier trotz der geringen Probenzahl bestätigt werden. Der hier verwendete Knochen stammte von einem 68jährigen Patienten mit Coxarthrose. Trotz des Alters des Patienten und der Vorschädigung des Knochens war es möglich, den Knochen physiologisch zu stimulieren und ein vermehrtes Wachstum zu induzieren.

Dies lässt sich auch mit der polychromen Sequenzmarkierung nachweisen. Es wurden zwar 3 Markierungen durchgeführt, jedoch waren in allen Knochenschnitten nur zwei Markierungen erkennbar. Bei dem zweiten Calcein-Labeling wurde nur

eine Laufzeit von 2 Stunden angesetzt. Dies genügte vermutlich nicht zur Anlagerung des Calceins entlang der Mineralisationsfront. Aus diesem Grund beziehen sich die hier angegebenen Werte für die MAR auf den Zeitraum zwischen dem 1. (Calcein) und dem 3. (Alizarin) Labeling.

Hier konnte eine durchschnittliche MAR von 0,59526 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ (bei einer SA von 0,30813) innerhalb aller Gruppen festgestellt werden. Zwischen den einzelnen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

In einem in-vivo Versuch konnte mittels eines Tetrazyklin Doppellabels eine MAR von 0,53 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei postmenopausalen Frauen festgestellt werden (101). Dies zeigt, dass die gewählte Belastung den Knochenstoffwechsel und Knochenumbau in einem physiologischen Bereich stimuliert haben muss.

In nachfolgenden Versuchen sollte darauf geachtet werden, dass die polychrome Sequenzmarkierung mit Fluorochromen verschiedener Farben abwechselnd durchgeführt wird, um eine bessere Abgrenzbarkeit und Auswertbarkeit zu erreichen. Die Labelingzeiten sollten gleich sein, um eine adäquate Anlagerung der Fluorochrome zu erreichen.

Das Fluorochrom Alizarin-Complexone soll einen zytotoxischen Effekt auf die Knochenzellen ausüben. Da in diesem Versuch auch oberhalb des Alizarin-Labels Osteoid nachweisbar war, mussten hier noch aktive, vitale Osteoblasten vorhanden sein. Ein zytotoxischer Effekt von Alizarin bei einer Laufzeit von 4 Stunden konnte bei der gewählten Konzentration nicht beobachtet werden und ist daher in diesem Versuch zu vernachlässigen.

Da sich auch in der Kontrollgruppe ein appositionelles Knochenwachstum zeigte, stellte sich die Frage, wodurch dieses hervorgerufen worden war. Zum Einen könnte die Nährstoffkonzentration im Kulturmedium noch zu hoch gewählt worden sein, zum Anderen könnte die Mediumflussrate Scherkräfte verursacht haben, welche ein vermehrtes Knochenwachstum induzierten. Beide Möglichkeiten sollten in weiteren Versuchen genauer untersucht werden, um diese Faktoren besser kontrollieren zu können.

Da in der Mason-Goldner-Färbung gezeigt werden konnte, dass in den Belastungsgruppen Osteoid und aktive Knochenoberfläche signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht waren, muss hier von einem deutlichen Einfluss der mechanischen Belastung auf das Knochenwachstum ausgegangen werden.

Zwischen den beiden Belastungsgruppen konnte in keiner Auswertung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies zeigt, dass beide Belastungsstufen innerhalb des physiologischen Stimulationsbereichs für trabekulären Knochen lagen. Eine weitere Differenzierung war bei der zuvor erläuterten Problematik bei der Kompression der Knochenproben in diesem Versuch nicht möglich. Eine genauere Untersuchung der Belastungsschwellen und von verschiedenen Belastungsreizen ist Gegenstand weiterer Arbeiten an diesem System.

Des Weiteren sollte genauer bestimmt werden, in welchem Bereich der Knochenproben ein vermehrter Umbau stattfindet. Dies soll zeigen, ob die mechanische Belastung nur auf einen Teil der Knochenprobe wirkt oder auf die gesamte Probe. Hierfür müsste die gesamte Knochenprobe in Dünnschnitte aufgearbeitet werden. Der Bereich, aus welchem jeder Dünnschnitt stammt, müsste genau protokolliert und die Ober- und Unterseite markiert werden. Dies würde eine weitere Aussage zur Qualität des Belastungssystems zulassen.

4.3 Pg E₂, IL-6, TNF- α , Osteoprotegerin

Die lokalen Mediatoren spielen bei der Regulation des Knochenumbaus eine entscheidende Rolle. In diesem Versuch wurde an 2 Tagen die PgE₂ Ausschüttung und an einem Tag die IL-6, TNF- α und Osteoprotegerin Ausschüttung über die Zeit bestimmt.

Die PgE₂ Ausschüttung war innerhalb der ersten Stunde nach Belastung in den beiden Belastungsgruppen an beiden Messtagen um das ca. Dreifache gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p = 0,001 - 0,002$). Nach 5, 6, 7, 11 und 12 Stunden lagen die Messwerte aller Gruppen deutlich niedriger in einem einheitlichen Bereich von 0,7 – 2,15 ng/ml. Die Rolle von PgE₂ in Bezug auf das Knochenwachstum ist noch nicht genau geklärt. Es ist fraglich, ob das Knochenwachstum von PgE₂ eher gefördert oder gehemmt wird (siehe Kapitel 1.2.2.1).

Die erhöhte Ausschüttung von PgE₂ nach der mechanischen Belastung, verbunden mit den hier beobachteten histologischen Veränderungen, lässt den Schluss zu, dass PgE₂ den Knochenumbau entscheidend mitsteuert. Ein vermehrter Knochenanbau ist eindeutig feststellbar. Es kann jedoch nicht genau beurteilt werden, wie und wo PgE₂ seine Wirkung entfaltet. Hierfür wäre es sinnvoll, die Ausschüttung von PgE₂ innerhalb der ersten Stunden genauer zu bestimmen. Die in diesem Versuch gewählten Zeitintervalle wurden aufgrund von Vorversuchen mit jungen, bovinen Knochen festgelegt. Um genauer beurteilen zu können, welche Zellarten vermehrt aktiviert werden, sollte zusätzlich zur aktiven Knochenoberfläche bestimmt werden, wo und in welchem Ausmaß aktive Osteoklasten nachweisbar sind.

Die Wirkung von IL-6 und TNF- α auf den Knochenstoffwechsel führt zu einer vermehrten Einwanderung und Aktivierung von Osteoklasten (siehe Kapitel 1.2.2).

Die mechanische Belastung führte in diesem Versuch zu einer vermehrten Ausschüttung von IL-6 und TNF- α innerhalb der ersten Stunde. Die Werte innerhalb der Kontrollgruppe waren jedoch ebenfalls erhöht, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten.

Die IL-6 Werte waren in den Belastungsgruppen um das ca. Dreifache gegenüber den übrigen Werten erhöht.

Die TNF- α Werte der Belastungsgruppen waren um das ca. Doppelte erhöht. Der 5 Stunden Wert der 2000- μ strain-Gruppe war ebenfalls deutlich erhöht.

Eine genauere Untersuchung der Einflüsse des Kulturmediums wäre auch in Bezug auf die lokalen Mediatoren ratsam. Eventuell beeinflusst das Kulturmedium, wenn es nach 2 Tagen gewechselt wird, durch sein Nährstoffangebot den Knochenstoffwechsel noch zu stark. Dies sollte Gegenstand eines weiteren Versuchs sein.

Auch wenn die IL-6 und TNF- α Messungen keine eindeutigen Ergebnisse zeigen, lässt die erhöhte Ausschüttung dieser Mediatoren die Vermutung zu, dass hier eine vermehrte Aktivierung von Osteoklasten stattgefunden haben muss.

Die Ausschüttung von Osteoprotegerin war in diesem Versuch nicht messbar. Vermutlich lagen die Konzentrationen hier unter der Nachweisgrenze für die gewählte Methode. Osteoprotegerin inhibiert die Osteoklasten (siehe Kapitel 1.2.2.6). Hier wäre es sicherlich interessant zu sehen, inwiefern Osteoklasten aktivierende Stoffe, wie IL-6 und TNF- α , und Osteoklasten inhibierende Stoffe, wie Osteoprotegerin, am Prozess des Remodeling teilhaben. Um die Osteoprotegerinausschüttung genauer zu untersuchen, müssen vermutlich längere Zeitintervalle zum Sammeln des Mediums verwandt werden, um eine entsprechend höhere Konzentration des Botenstoffs zu erreichen.

Die histologische Auswertung verbunden mit den Ergebnissen der Mediatorenausschüttung zeigt, dass hier kein isolierter Knochenauf- oder Knochenabbau stattgefunden hat, sondern dass durch die mechanische Belastung ein vermehrter Knochenumbau induziert wurde.

Einerseits wurde die aktive Knochenoberfläche erhöht und vermehrt Osteoid gebildet, andererseits wurden Mediatoren freigesetzt, die den Knochenabbau fördern. Die statistische Auswertung der Messungen führte aufgrund der geringen Probenanzahl pro Gruppe noch nicht zu absolut gesicherten Werten, da einzelne Ausreißer zu große Streuungen verursachen. Es konnten jedoch eindeutige Effekte der mechanischen Belastung auf den Knochen nachgewiesen werden.

Eine höhere Anzahl von Proben pro Gruppe wäre wünschenswert, um genaue und sichere Ergebnisse zu erzielen. Dies ist momentan noch nicht möglich, da die Belastung der Knochenproben zu zeitaufwändig ist und aus einem einzelnen Hüftkopf nur eine sehr begrenzte Zahl an Proben gewonnen werden kann.

4.4 Ausblick

In dem vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass das ZETOS-System ein Kultur- und Messsystem mit komplexen Möglichkeiten zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Knochen darstellt.

Die Automatisierung des Belastungsvorgangs ist eines der nächsten Ziele, das erreicht werden sollte, um den Zeitaufwand während der Versuchsdurchführung zu optimieren. So wäre es möglich, mehr Knochenproben zu bearbeiten, was zu einer verbesserten statistischen Aussagekraft der Versuche führen würde.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, sollte mehr als ein Hüftkopf aufgearbeitet werden. Die Reaktion von Knochen verschiedener Spender sollte genauer untersucht werden, um zu allgemein gültigen Ergebnissen zu gelangen.

Das vorliegende Model des ZETOS-Systems erlaubt es, die Wirkungen von Pharmaka und Biomaterialien auf trabekulären Knochen unter kontrollierten Kultur- und Belastungsbedingungen zu untersuchen. Es wäre möglich, das Einwachsverhalten verschiedener Prothesenmaterialien kontrolliert zu beobachten. Ebenfalls wäre es möglich, den Einfluss von Abriebpartikeln von Prothesenmaterial auf die Knochenproben zu untersuchen. Es besteht auch die Möglichkeit, exogen zugeführte Pharmaka und Hormone in Bezug auf ihren Einfluss auf das Knochenwachstum zu testen. Hierbei wären sicherlich die benötigten lokalen Wirkstoffkonzentrationen von besonderem Interesse.

Weiterhin ist geplant, mesenchymale Stammzellen auf einer Kalkmatrix anzuzüchten, um diese dann im ZETOS-System zu kultivieren und zu belasten. Eine Umwandlung der Stammzellen und deren Wachstumsverhalten soll untersucht werden.

Das ZETOS-System ist Tierversuchen und auch Zellkulturexperimenten überlegen, da es einerseits möglich ist, die Kulturbedingungen und auch die mechanische Belastung genau zu kontrollieren, was im Tierversuch nicht zu verwirklichen ist, andererseits beziehen sich alle Untersuchungen und Ergebnisse auf vollständige Knochenproben, wobei sich Zellkulturexperimente immer nur auf einzelne Zellarten beschränken.

5 Anhang

5.1 Verbrauchsmaterialien & Apparaturen

5.1.1 Verbrauchsmaterialien

PBS (Biochrom KG)

DMEM (Gibco)

HEPES (Sigma)

FCS (Biochrom KG)

Earls Solution (Biochrom KG)

Calcein (Sigma)

Alizarin Complexone (ICN Biomedicals Inc.)

Jonosteril-Infusions-Lösung (Braun)

NaCl-0,9%-Lösung (Braun)

Penicillin (PAA Laboratories)

Streptomycin (PAA Laboratories)

Amphotericin B (Sigma)

Ethanol (Merck)

Entellan (Merck)

Xylol (Kulzer)

MEA (Kulzer)

Technovit 9100 (Kulzer)

Rollrandschnappdeckelgläser (Scherf Glas)

Bechergläser (Biochrom KG)

Petrischalen (Nunclon Surface)

Rundbodengläser (Kobe)

Mediumflasche 1000 ml (Biochrom KG)

Spritze 50 ml (Luer-Lock)

Mikroröhren 2 ml (Sarstedt)

Silikonschläuche (Norton)

Pumpenschläuche (Gilson)

Konnektoren (Luer-Lock)

Infusionssysteme (Braun)
3-Wege-Hähne (OHMEDA)
Pipetten (Gilson)
Pipetten (Greiner-Bio-One)
Pipettierer (Brand)
Pipettenspitzen (Eppendorf)
Handschuhe (Ansell-Medical)
Mundschutz (Ethicon)
Objektträger (Menzel-Gläser)
Deckgläser (Superior-Marienfeld)
Polyethylenfolie (Kulzer)

5.1.2 Apparaturen

ZETOS-System (Jones & Smith / Marburg)
Sterile Werkbank (Gelaire)
Bandsäge (Exakt Apparatebau GmbH)
Präzisionsbohrer (Proxxon GmbH)
Probenrotator (Heidolph)
pH-Meter (Inolab)
Perfusionspumpe (Ismatec)
Hartschnittmikrotom (Reichert-Jung)
Durchlichtmikroskop (Zeiss)
Farbvideokamera (Sony)

5.2 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA – Analysis of Variance
Aqua dest. – destilliertes Wasser
Aqua bidest. – doppelt destilliertes Wasser
BMU – Basic Metabolic Unit
cAMP – zyklisches Adenosin Mono Phosphat
DMEM – Dulbeccos Modified Eagle Medium
FCS – fetales Kälberserum
G6PD – Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
gp130 – Glycoprotein 130
Hz – Hertz
IGF – Insulin Like Growth Factor
IL – Interleukin
KBS – Kultur- und Belastungssystem
KBK – Kultur- und Belastungskammer
MAR – Mineral Apposition Rate
2-MEA – 2-Methoxyethylacetat
N – Newton
ng - Nanogramm
OPG - Osteoprotegerin
PEA – Piezo Elektrischer Aktuator
Pg – Prostaglandin
pg – Pikogramm
PTH – Parathormon
SA - Standardabweichung
STAT – Signal Transducers and Activators of Transcription
STP – Signaltransduktionsproteine
TEP – Totalendoprothese
TNF – Tumornekrosefaktor
Vit – Vitamin

5.3 Literaturverzeichnis

1. Abbas AK, Burstein HJ, Bogen SA: Determinants of helper T cell-dependent antibody production. *Semin Immunol* 5:441-447, 1993
2. al Humidan A, Ralston SH, Hughes DE, Chapman K, Aarden L, Russell RG, Gowen M: Interleukin-6 does not stimulate bone resorption in neonatal mouse calvariae. *J Bone Miner Res* 6:3-8, 1991
3. Alshihabi SN, Chang YS, Frangos JA, Tarbell JM: Shear stress-induced release of PGE2 and PGI2 by vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:808-814, 1996
4. Andersson G, Ek-Rylander B: The tartrate-resistant purple acid phosphatase of bone osteoclasts--a protein phosphatase with multivalent substrate specificity and regulation. *Acta Orthop Scand Suppl* 266:189-94.:189-194, 1995
5. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC: Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* 95:2886-2895, 1995
6. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR: Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 319:516-518, 1986
7. Boppart MD, Kimmel DB, Yee JA, Cullen DM: Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading. *Bone* 23:409-415, 1998
8. Brandstrom H, Bjorkman T, Ljunggren O: Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:831-835, 2001
9. Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C, Vidal O, Ljunghall S, Ljunggren O: Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human

- bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 247:338-341, 1998
10. Broekmann E: Bestimmung elastischer und viskoelastischer Kenngrößen von Knochenproben unter Langzeitkultu-Bedingungen mit einem neuartigen softwaregesteuerten elektro-mechanischen Blastungs- und Messsystem. Dissertation; Marburg , 2004.
 11. Burger EH, Klein-Nulend J: Mechanotransduction in bone - role of the lacuno-canalicular network 16. *FASEB J* 13 Suppl:S101-12.:S101-S112, 1999
 12. Burger EH, Klein-Nulend J, Veldhuijzen JP: Mechanical stress and osteogenesis in vitro 31. *J Bone Miner Res* 7 Suppl 2:S397-401.:S397-S401, 1992
 13. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL: The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145:527-538, 1999
 14. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL: The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 145:527-538, 1999
 15. Caillot-Augusseau A, Lafage-Proust MH, Soler C, Pernod J, Dubois F, Alexandre C: Bone formation and resorption biological markers in cosmonauts during and after a 180-day space flight (Euromir 95). *Clin Chem* 44:578-585, 1998
 16. Canalis E: Effects of tumor necrosis factor on bone formation in vitro. *Endocrinology* 121:1596-1604, 1987
 17. Chambers TJ, Darby JA, Fuller K: Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption. *Cell and Tissue Research* 671-675, 1985

18. Cheng MZ, Zaman G, Rawlinson SC, Pitsillides AA, Suswillo RF, Lanyon LE: Enhancement by sex hormones of the osteoregulatory effects of mechanical loading and prostaglandins in explants of rat ulnae. *J Bone Miner Res* 12:1424-1430, 1997
19. Clohisy JC, Scott DK, Brakenhoff KD, Quinn CO, Partridge NC: Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 6:1834-1842, 1992
20. Coelho MJ, Cabral AT, Fernande MH: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. *Biomaterials* 21:1087-1094, 2000
21. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P: Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 276:20659-20672, 2001
22. Cowin SC: On mechanosensation in bone under microgravity. *Bone* 22:119S-125S, 1998
23. Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML: Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng* 113:191-197, 1991
24. Dalsky GP, Stocke KS, Ehsani AA, Slatopolsky E, Lee WC, Birge SJ, Jr.: Weight-bearing exercise training and lumbar bone mineral content in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 108:824-828, 1988
25. de la MJ, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD: Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 95:2846-2852, 1995
26. Dexter M, Allen T: Haematopoiesis. Multi-talented stem cells? *Nature* 360:709-710, 1992

27. Dillaman RM, Roer RD, Gay DM: Fluid movement in bone: theoretical and empirical. *J Biomech* 24 Suppl 1:163-77.:163-177, 1991
28. Dodds RA, Ali N, Pead MJ, Lanyon LE: Early loading-related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae in vivo. *J Bone Miner Res* 8:261-267, 1993
29. Doty SB: Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 33:509-512, 1981
30. Duncan RL, Turner CH: Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 57:344-358, 1995
31. Eriksen EF, Gundersen HJ, Melsen F, Mosekilde L: Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res* 5:243-252, 1984
32. Feldman GM, Petricoin EF, III, David M, Larner AC, Finbloom DS: Cytokines that associate with the signal transducer gp130 activate the interferon-induced transcription factor p91 by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 269:10747-10752, 1994
33. Forwood MR, Turner CH: Skeletal adaptations to mechanical usage: results from tibial loading studies in rats. *Bone* 17:197S-205S, 1995
34. Frost HM: Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec* 226:414-422, 1990
35. Fuller K, Chambers TJ: Effect of arachidonic acid metabolites on bone resorption by isolated rat osteoclasts. *J Bone Miner Res* 4:209-215, 1989
36. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ: TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 188:997-1001, 1998

37. Gleeson PB, Protas EJ, LeBlanc AD, Schneider VS, Evans HJ: Effects of weight lifting on bone mineral density in premenopausal women. *J Bone Miner Res* 5:153-158, 1990
38. Green EA, Flavell RA: TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J Exp Med* 189:1017-1020, 1999
39. Guerriero C, De Santis D, Nocini PF, Gotte P, Armato U: Tissue culture of adult human osteoblasts isolated from jaw bones. *Ital J Anat Embryol* 100 Suppl 1:83-93.:83-93, 1995
40. Hahn M, Vogel M, Amling M, Ritzel H, Delling G: Microcallus formations of the cancellous bone: a quantitative analysis of the human spine. *J Bone Miner Res* 10:1410-1416, 1995
41. Haynes DR, Hay SJ, Rogers SD, Ohta S, Howie DW, Graves SE: Regulation of bone cells by particle-activated mononuclear phagocytes. *J Bone Joint Surg Br* 79:988-994, 1997
42. Hilton DJ, Hilton AA, Raicevic A, Rakar S, Harrison-Smith M, Gough NM, Begley CG, Metcalf D, Nicola NA, Willson TA: Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J* 13:4765-4775, 1994
43. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S: Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140:4382-4389, 1999
44. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL: Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140:4367-4370, 1999
45. Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T, Khosla S: Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-

- kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:334-339, 2001
46. Horowitz SM, Purdon MA: Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants. *Calcif Tissue Int* 57:301-305, 1995
47. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ: Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3540-3545, 1999
48. Huang S, Terstappen LW: Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 368:664, 1994
49. Ipavec M, Brand RA, Pedersen DR, Mavcic B, Kralj-Iglic V, Iglic A: Mathematical modelling of stress in the hip during gait. *J Biomech* 32:1229-1235, 1999
50. Jayasinghe JA, Jones SJ, Boyde A: Scanning electron microscopy of human lumbar vertebral trabecular bone surfaces. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 422:25-34, 1993
51. Jeansonne BG, Feagin FF, McMinn RW, Shoemaker RL, Rehm WS: Cell-to-cell communication of osteoblasts. *J Dent Res* 58:1415-1423, 1979
52. Jee WS, Mori S, Li XJ, Chan S: Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone* 11:253-266, 1990
53. Jee WS, Ueno K, Deng YP, Woodbury DM: The effects of prostaglandin E2 in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation. *Calcif Tissue Int* 37:148-157, 1985

54. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC: Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257:88-91, 1992
55. Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR, Roodman GD: Tumors producing human tumor necrosis factor induced hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice. *Endocrinology* 124:1424-1427, 1989
56. Jones D, Leivseth G, Tenbosch J: Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem Cell Biol* 73:525-534, 1995
57. Jones DB, Nolte H, Scholubbers JG, Turner E, Veltel D: Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 12:101-110, 1991
58. Jones DB, Scholubbers JG: A role for PI-phospholipase C in the medium of mechanical stress in bone surface cells. *Calcif Tissue Int* 97-106, 1989
59. Kawaguchi H, Pilbeam CC, Harrison JR, Raisz LG: The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* 36-46, 1995
60. Ke HZ, Jee WS, Mori S, Li XJ, Kimmel DB: Effects of long-term daily administration of prostaglandin-E2 on maintaining elevated proximal tibial metaphyseal cancellous bone mass in male rats. *Calcif Tissue Int* 50:245-252, 1992
61. Kishimoto T, Taga T, Akira S: Cytokine signal transduction. *Cell* 76:253-262, 1994
62. Klapdohr HP: Der ZETOS, ein Kultur-und Belastungssystem für trabekuläre Knochen, Untersuchung an humanen Knochenzy lindern. Dissertation; Marburg, 2003.
63. Klein-Nulend J, Sterck JG, Semeins CM, Lips P, Joldersma M, Baart JA, Burger EH: Donor age and mechanosensitivity of human bone cells 1. *Osteoporos Int* 13:137-146, 2002

64. Klein-Nulend J, van der PA, Semeins CM, Ajubi NE, Frangos JA, Nijweide PJ, Burger EH: Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro 29. *FASEB J* 9:441-445, 1995
65. Klein-Nulend J, Veldhuijzen JP, de Jong M, Burger EH: Increased bone formation and decreased bone resorption in fetal mouse calvaria as a result of intermittent compressive force in vitro 38. *Bone Miner* 2:441-448, 1987
66. Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, Kanaoka K, Miyazaki-Kawashita Y, Nakashima T, Shibata M, Kobayashi K, Kato Y, Sakai H: Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res* 15:1924-1934, 2000
67. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM: Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 21:495-502, 2000
68. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402:304-309, 1999
69. Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD: IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 144:4226-4230, 1990
70. Kurihara N, Civin C, Roodman GD: Osteotropic factor responsiveness of highly purified populations of early and late precursors for human multinucleated cells expressing the osteoclast phenotype. *J Bone Miner Res* 6:257-261, 1991
71. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176, 1998

72. Lanyon LE: Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 36 Suppl 1:S56-61.:S56-S61, 1984
73. Lanyon LE: Control of bone architecture by functional load bearing. *J Bone Miner Res* 7 Suppl 2:S369-75.:S369-S375, 1992
74. Lanyon LE: Using functional loading to influence bone mass and architecture: objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone. *Bone* 18:37S-43S, 1996
75. Lean JM, Jagger CJ, Chambers TJ, Chow JW: Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol* 268:E318-E327, 1995
76. Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA: Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to interleukin 1. *Endocrinology* 121:1164-1170, 1987
77. Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Toyama Y, Yabe Y, Higashio K, Suda T: Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 246:199-204, 1998
78. Miyamoto A, Kunisada T, Hemmi H, Yamane T, Yasuda H, Miyake K, Yamazaki H, Hayashi SI: Establishment and characterization of an immortal macrophage-like cell line inducible to differentiate to osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 242:703-709, 1998
79. Modis L, Petko M, Foldes I: Histochemical examination of supporting tissues by means of fluorescence. II. Fluorochromes as an indicator of lamellar bone mineralization. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 17:157-166, 1969
80. Morey-Holton ER, Arnaud SB: Spaceflight and calcium metabolism. *Physiologist* 28:S9-12, 1985

81. Murray DW, Rushton N: The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: a new experimental method. *Calcif Tissue Int* 47:35-39, 1990
82. Myers DE, Collier FM, Minkin C, Wang H, Holloway WR, Malakellis M, Nicholson GC: Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett* 463:295-300, 1999
83. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K: RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253:395-400, 1998
84. Nakagawa N, Yasuda H, Yano K, Mochizuki S, Kobayashi N, Fujimoto H, Shima N, Morinaga T, Chikazu D, Kawaguchi H, Higashio K: Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265:158-163, 1999
85. Nefussi JR, Baron R: PGE2 stimulates both resorption and formation of bone in vitro: differential responses of the periosteum and the endosteum in fetal rat long bone cultures. *Anat Rec* 211:9-16, 1985
86. Notelovitz M, Martin D, Tesar R, Khan FY, Probart C, Fields C, McKenzie L: Estrogen therapy and variable-resistance weight training increase bone mineral in surgically menopausal women. *J Bone Miner Res* 6:583-590, 1991
87. Okuda A, Taylor LM, Heersche JN: Prostaglandin E2 initially inhibits and then stimulates bone resorption in isolated rabbit osteoclast cultures. *Bone Miner* 7:255-266, 1989
88. Onyia JE, Miles RR, Yang X, Halladay DL, Hale J, Glasebrook A, McClure D, Seno G, Churgay L, Chandrasekhar S, Martin TJ: In vivo demonstration that human parathyroid hormone 1-38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res* 15:863-871, 2000

89. Parfitt AM: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55:273-286, 1994
90. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610, 1987
91. Pattin CA, Caler WE, Carter DR: Cyclic mechanical property degradation during fatigue loading of cortical bone. *J Biomech* 29:69-79, 1996
92. Pead MJ, Suswillo R, Skerry TM, Vedi S, Lanyon LE: Increased 3H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo. *Calcif Tissue Int* 43:92-96, 1988
93. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD: Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *J Bone Miner Res* 4:113-118, 1989
94. Pilbeam CC, Raisz LG, Voznesensky O, Alander CB, Delman BN, Kawaguchi H: Autoregulation of inducible prostaglandin G/H synthase in osteoblastic cells by prostaglandins. *J Bone Miner Res* 10:406-414, 1995
95. Raab-Cullen DM, Akhter MP, Kimmel DB, Recker RR: Periosteal bone formation stimulated by externally induced bending strains. *J Bone Miner Res* 9:1143-1152, 1994
96. Raab-Cullen DM, Thiede MA, Petersen DN, Kimmel DB, Recker RR: Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. *Calcif Tissue Int* 55:473-478, 1994
97. Raab DM, Crenshaw TD, Kimmel DB, Smith EL: A histomorphometric study of cortical bone activity during increased weight-bearing exercise. *J Bone Miner Res* 6:741-749, 1991

98. Rahn BA, Perren SM: Calcein blue as a fluorescent label in bone. *Experientia* 26:519-520, 1970
99. Rahn BA, Perren SM: [Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling]. *Experientia* 28:180, 1972
100. Raisz LG, Fall PM: Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* 126:1654-1659, 1990
101. Recker RR, Kimmel DB, Parfitt AM, Davies KM, Keshawaraz N, Hinders S: Static and tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. *J Bone Miner Res* 3:133-144, 1988
102. Reich KM, Frangos JA: Effect of flow on prostaglandin E2 and inositol trisphosphate levels in osteoblasts. *Am J Physiol* 261:C428-C432, 1991
103. Reich KM, Frangos JA: Protein kinase C mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 52:62-66, 1993
104. Ren GH, Pei GX, Gu LQ, Wang K, Jin D, Wei KH, Chen B, Mo XH: [Biocompatibility of adult human osteoblasts with coral-derived hydroxyapatite in vitro]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 22:974-978, 2002
105. Roodman GD: Role of cytokines in the regulation of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 53 Suppl 1:S94-S98, 1993
106. Roodman GD, Kurihara N, Ohsaki Y, Kukita A, Hosking D, Demulder A, Smith JF, Singer FR: Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J Clin Invest* 89:46-52, 1992
107. Rosenquist JB, Ohlin A, Lerner UH: Cytokine-induced inhibition of bone matrix proteins is not mediated by prostaglandins. *Inflamm Res* 45:457-463, 1996
108. Ross FP: RANKing the importance of measles virus in Paget's disease. *J Clin Invest* 105:555-558, 2000

109. Rubin CT, Lanyon LE: Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am* 66:397-402, 1984
110. Rubin CT, Lanyon LE: Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* 37:411-417, 1985
111. Rubin CT, Lanyon LE: Kappa Delta Award paper. Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone. *J Orthop Res* 5:300-310, 1987
112. Sardesai VM: The essential fatty acids. *Nutr Clin Pract* 7:179-186, 1992
113. Schirrmacher K, Schmitz I, Winterhager E, Traub O, Brummer F, Jones D, Bingmann D: Characterization of gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif Tissue Int* 51:285-290, 1992
114. Sehgal PB, Wang L, Rayanade R, Pan H, Margulies L: Interleukin-6-type cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 762:1-14.:1-14, 1995
115. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT: Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty* 10:498-506, 1995
116. Sheehan KC, Pinckard JK, Arthur CD, Dehner LP, Goeddel DV, Schreiber RD: Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75. *J Exp Med* 181:607-617, 1995
117. Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LE: Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J Bone Miner Res* 4:783-788, 1989
118. Slowik MR, De Luca LG, Fiers W, Pober JS: Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol* 143:1724-1730, 1993

119. Smith EL, Gilligan C, McAdam M, Ensign CP, Smith PE: Deterring bone loss by exercise intervention in premenopausal and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 44:312-321, 1989
120. Stea S, Visentin M, Granchi D, Ciapetti G, Donati ME, Sudanese A, Zanotti C, Toni A: Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine* 12:1575-1579, 2000
121. Steck R, Niederer P, Knothe Tate ML: A finite difference model of load-induced fluid displacements within bone under mechanical loading. *Med Eng Phys* 22:117-125, 2000
122. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357, 1999
123. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N: Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 17:87S-91S, 1995
124. Suzuki HK, Mathews A: Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein. *Stain Technol* 41:57-60, 1966
125. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T: Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58:573-581, 1989
126. Taichman RS, Emerson SG: Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 179:1677-1682, 1994
127. Taichman RS, Emerson SG: The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* 16:7-15, 1998
128. Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG: Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood* 87:518-524, 1996

129. Takai H, Kanematsu M, Yano K, Tsuda E, Higashio K, Ikeda K, Watanabe K, Yamada Y: Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 273:27091-27096, 1998
130. Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ: Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol* 138:775-779, 1987
131. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K: Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 234:137-142, 1997
132. Turner CH, Forwood MR, Rho JY, Yoshikawa T: Mechanical loading thresholds for lamellar and woven bone formation. *J Bone Miner Res* 9:87-97, 1994
133. Turner CH, Owan I, Alvey T, Hulman J, Hock JM: Recruitment and proliferative responses of osteoblasts after mechanical loading in vivo determined using sustained-release bromodeoxyuridine. *Bone* 22:463-469, 1998
134. Turner CH, Woltman TA, Belongia DA: Structural changes in rat bone subjected to long-term, in vivo mechanical loading. *Bone* 13:417-422, 1992
135. Tyson DR, Swarthout JT, Partridge NC: Increased osteoblastic c-fos expression by parathyroid hormone requires protein kinase A phosphorylation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein at serine 133. *Endocrinology* 140:1255-1261, 1999
136. Ueno K, Haba T, Woodbury D, Price P, Anderson R, Jee WS: The effects of prostaglandin E2 in rapidly growing rats: depressed longitudinal and radial growth and increased metaphyseal hard tissue mass. *Bone* 6:79-86, 1985
137. Van der Weil CJ, Parfitt AM: An ultrastructural study of the components which make up the resting surface of bone. *Bone Histomorphology Third international workshop* 3:109-116, 1980

138. Vandenabeele P, Declercq W, Vanhaesebroeck B, Grooten J, Fiers W: Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol* 154:2904-2913, 1995
139. Vidal NO, Brandstrom H, Jonsson KB, Ohlsson C: Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* 159:191-195, 1998
140. Vidal ON, Sjogren K, Eriksson BI, Ljunggren O, Ohlsson C: Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 alpha in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248:696-700, 1998
141. Walsh WR, Guzelsu N: Ion concentration effects on bone streaming potentials and zeta potentials. *Biomaterials* 14:331-336, 1993
142. Wan M, Shi X, Feng X, Cao X: Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem* 276:10119-10125, 2001
143. Wolff J. Das Gesetz der Transformation der Knochen. 1994. p.152, A. Hirschwald, Berlin, 1892, A. Hirschwald.
144. Yang L, Tao T, Wang X, Du N, Chen W, Tao S, Wang Z, Wu L: Effects of dexamethasone on proliferation, differentiation and apoptosis of adult human osteoblasts in vitro. *Chin Med J (Engl)* 116:1357-1360, 2003
145. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K: Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 139:1329-1337, 1998
146. Zaman G, Suswillo RF, Cheng MZ, Tavares IA, Lanyon LE: Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone-derived cells in culture. *J Bone Miner Res* 12:769-777, 1997

5.4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Etablierung eines neuen Kultur- und Belastungssystems für trabekulären Knochen wurden die Möglichkeiten der Langzeitkultur von humanem Knochen untersucht. Das unter dem Namen ZETOS in Marburg von Jones und Smith entwickelte Kultur- und Belastungssystem bietet die Möglichkeit zylinderförmige Knochenproben (1 cm Ø, 0,5 cm hoch) unter kontrollierten Bedingungen in Kultur zu halten und diese mechanisch zu belasten. Hierbei können die Größen Kompression und Kraft gesteuert und gemessen werden.

Ziel des Versuchs war es, trabekuläre Knochenproben aus dem Hüftkopf eines 68jährigen Patienten, der sich einer Hüft-TEP Operation unterziehen musste, über mehrere Wochen in Kultur zu halten und diese mechanisch zu belasten.

Es konnten insgesamt 20 Knochenproben aus dem Hüftkopf gewonnen werden. Zwei Proben schieden aufgrund von Infektionen vorzeitig aus dem Versuch aus. Letztendlich konnten 18 Proben über insgesamt 50 Tage in Kultur gehalten werden.

Zu Beginn wurden drei Versuchsgruppen gebildet. Zwei Belastungsgruppen, welche zum Einen mit 2000 μ strain, zum Anderen mit 4000 μ strain über 5 Minuten täglich mit einer Frequenz von 1 Hz belastet wurden. Die dritte Gruppe wurde als Kontrolle nicht belastet.

Die Knochenproben wurden während des Versuchs an drei Tagen mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen gelabelt. Die spätere histologische Aufarbeitung sollte zeigen, ob ein messbares Knochenwachstum stattgefunden hat.

An zwei Tagen wurde nach Belastung über 12 Stunden Prostaglandin E2 und am zweiten Messtag zusätzlich Il-6, TNF- α und Osteoprotegerin bestimmt. Hier sollten die lokalen Regulationsmechanismen des Knochenstoffwechsels genauer untersucht werden.

In allen drei Versuchsgruppen konnte histologisch ein Knochenwachstum mit einer durchschnittlichen MAR von 0,59526 μ m/Tag festgestellt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Jedoch waren in den Belastungsgruppen die Osteoidbildung sowie die aktive Knochenoberfläche signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Ebenfalls waren Pg E2, Il-6 und TNF- α in den Belastungsgruppen eine Stunde nach Belastung signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Die Vitalität der Knochenproben über den Versuchszeitraum konnte durch die vermehrte Osteoidbildung innerhalb der Proben und durch die messbare Ausschüttung von lokalen Mediatoren nachgewiesen werden. Bei der Reaktion der Knochenproben auf die Belastung muss von der Induktion eines vermehrten Knochenumbaus ausgegangen werden, da einerseits ein nachweisbarer Knochenaufbau stattfand, andererseits vermehrt Mediatoren in Form von Il-6 und TNF- α ausgeschüttet wurden, die dem Knochenabbau über Aktivierung von Osteoklasten dienen.

Die Messung des E-Moduls führte aufgrund von Kalibrierungsschwankungen der Kompressionseinheit zu keinen verwertbaren Ergebnissen. Die Messung der aufgewendeten Kräfte zeigte aber, dass eine Belastung im physiologischen Bereich erfolgt war. Die Höhe der Kompression konnte hier nicht genau ermittelt werden.

Die Weiterentwicklung des Systems ist Ziel weiterer Arbeiten. Die Automatisierung des Kultur- und Belastungsvorgangs soll die Möglichkeit zur Untersuchung größerer Probenzahlen ermöglichen, um reproduzierbare Daten unter kontrollierten Bedingungen zu erhalten.

5.4 Summary

The ZETOS system is an ex-vivo culturing und loading system for trabecular bone cores. Cylindrical bone cores (10x5mm) from a human femur head of a 68 year old male patient who had a hip replacement because of a coxarthrosis were cultured over 50 days. Twenty trabecular bone cores were obtained from the femur head. Two samples got lost because of infection. At the beginning three groups were randomly formed. Two groups were loaded with a compression of 2000 and 4000 μ strain for five minutes per day with one Hz. The third group was the non-loaded control group. The applied force while compression was measured simultaneously.

To examine bone growth the bone cores were labeled with the fluorescence colouring Calcein and Alizarin red on three days of the study time. Prostaglandin E2 was measured on two days over twelve hours after loading. On the second sample day IL-6, TNF- α and Osteoprotegerin was measured to examine local regulation of bone metabolism.

A bone growth with an average MAR of 0,59526 μ m/day can be seen in all groups, but there was no significant differences between the loaded and the non-loaded groups. Osteoid and active bone surface was significant increased in the loaded groups. One hour after loading there was a significant increase of Prostaglandin E2, IL-6 and TNF- α within the loading groups. The vitality of the bone cores can be seen in the active bone metabolism, as building osteoid, increasing active bone surface and producing cytokines like Pg-E2, IL-6 and TNF- α .

Mechanical loading seems to induce bone remodeling. Increased Osteoid and active bone surface are signs of bone formation, but increased levels of IL-6 and TNF- α are inducing osteoclasts and bone resorption.

The exact compression could not be calculated because of calibration differences within the loading system. The E-Modul could not be calculated. The measured forces applied while compression showed a physiological loading of the bone cores, compared to the forces applied to an in-vivo human femur head.

The development of the system and the examination of different loading and culture conditions is the issue of further studies.

5.5 Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Czubayko, Daut, Doss, Eilers, Feuss, Geus, Gotzen, Griss, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Krieg, Lammel, Lang, Lennartz, Lippert, Löffler, Maisch, Moll, Müller, Mutters, Oertel, Reichardt, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seyberth, Vohland, von Wichert, Weihe, Werner

in Kassel:

Hesterberg, Neutzner, Pausch, Tryba

5.6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Ulrich Boudriot für die Überlassung und Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. D.B. Jones und Prof. Dr. E.L. Smith gilt besonderer Dank für die Entwicklung des ZETOS Systems und für die Überlassung des Systems und der Laboreinrichtung zur Durchführung der Arbeit.

Ein Dank geht an Frau Marita Kratz für die Einarbeitung am ZETOS System und für die Hilfe bei der Planung und Durchführung des Versuchs.

Weiterhin danke ich Dr. Eckhardt Bröckmann und Herrn Torsten Pohl für die technische Entwicklung und Betreuung des ZETOS Systems.

Ich danke Prof. Dr. Neumann, Labor der Kinderklinik der Philipps-Universität Marburg, für die Messung der Prostaglandine und Prof. Dr. H. Renz, Zentrallabor der Philipps-Universität Marburg, für die Messung der Zytokine.

Ich danke Dr. Brandt, Orthopädie Martin-Luther-Universität Halle, für die Programmierung der Macros zur histologischen Vermessung und Auswertung der Präparate und für die Einarbeitung an dem Auswertesystem.

Ich danke Kai Koller und Florian Martens für die Einarbeitung im Labor und für die Hilfe bei den ersten Schritten.

Letztlich danke ich meiner geliebten Frau Eva-Maria für unglaubliche Geduld und Hilfe und meiner Familie für immerwährende Unterstützung.